

RESUMO

A glico-hemoglobina (GHb) é um parâmetro importante no controle glicêmico de pacientes com DM. Vários estudos clínicos mostraram claramente que a melhora no controle glicêmico está fortemente associada com a diminuição no desenvolvimento e/ou progressão das complicações em diabetes melito tipos 1 e 2. A medida exata e precisa da GHb é uma questão importante para os laboratórios clínicos. Vários fatores afetam os resultados e podem levar a resultados errôneos. Nesta revisão, discutimos os problemas da padronização da determinação da GHb para monitorar a terapia diabética e também os principais fatores interferentes. Os métodos para GHb podem ser diferentemente afetados pelas interferências. O efeito da interferência pode ser clinicamente mais relevante com o pior controle glicêmico. O laboratório deve estar atento para estes fatores para evitar confusão na interpretação clínica dos resultados, e os clínicos devem contatar o laboratório sempre que houver discrepância entre a impressão clínica e o resultado laboratorial. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/4:451-463**)

Descritores: Hemoglobina glicada; Controle metabólico do DM; Medida de GHb; Hemoglobina anômala; Anemia; Drogas

ABSTRACT

Glycohemoglobin (GHb): Clinical and Analytical Aspects.

Glycohemoglobin (GHb) has a key role in the assessment of glycemic control in diabetic patients. Several studies have clearly shown that improved glycemic control is strongly associated with decreased development and/or progression of diabetic complications in both type 1 and 2 diabetes mellitus. Therefore, accurate determination of GHb concentration is an important issue for clinical laboratories. Several factors may affect and lead to erroneous results. We discuss the problems of standardization of GHb measurements for monitoring glycemic control and also consider the potential interfering factors on GHb measurements. Moreover, GHb assays may be affected by interference in different ways. The effect of interference may be more clinically relevant with poor metabolic control. Laboratory staff must be aware of all pitfalls to avoid adding more confusion to the clinical interpretation of HbA_{1c} values and physicians should contact laboratories if discrepancies between clinical impressions and laboratory data are observed. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2004;48/4:451-463**)

Keywords: Glycated hemoglobin; Metabolic control; Sample storage; Variant hemoglobin; Anemia; Drugs

Importância do Diabetes Melito e Uso Clínico da GHb/HbA_{1c}

O DIABETES MELITO (DM) pode se acompanhar de complicações crônicas micro e macrovasculares que estão associadas a elevada morbidade

*Joíza Lins Camargo
Jorge Luiz Gross*

*Unidade de Bioquímica do Serviço
de Patologia Clínica (JLC) e
Serviço de Endocrinologia (JLG),
Hospital de Clínicas de Porto
Alegre, Porto Alegre, RS.*

*Recebido em 29/12/03
Revisado em 15/06/04
Aceito em 23/06/04*

e mortalidade.

A nefropatia diabética acomete mais de um terço dos pacientes e é a causa mais comum de doença renal terminal e ingresso em programas de hemodiálise (1), e a retinopatia diabética é a principal causa de cegueira entre os 20–74 anos. As doenças cardiovasculares (DCV) são responsáveis por mais de 50% das mortes em pacientes com DM tipo 2 (DM2) e também por 30% das internações em centros de tratamento intensivo (2).

Os níveis glicêmicos são um fator determinante do desenvolvimento e progressão das complicações do DM (3,4). A medida da glico-hemoglobina (GHb) é o parâmetro de referência para avaliar o grau do controle glicêmico em pacientes com DM (5). A Associação Americana de Diabetes (ADA) recomenda que a GHb seja medida regularmente em todos os pacientes a intervalos de 4 a 6 meses (6). Considerando a alta prevalência do DM e o impacto das complicações da doença na sociedade, a dosagem da GHb é um dos procedimentos mais importantes no laboratório clínico atual. O número de requisições deste teste tem aumentado consideravelmente nos últimos dez anos, e os laboratórios devem estar preparados para fornecer resultados exatos e precisos de GHb, para ajudar o clínico a prevenir e manejar as complicações do DM. No Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o número médio de requisições mensais para GHb era 340 em 1996 e aumentou para 750 em 2003, indicando um aumento de 120% no número de exames realizados mensalmente (dados da Unidade de Bioquímica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre).

As dosagens de GHb foram disponibilizadas no laboratório clínico no início da década de 80 (7). O teste foi logo introduzido na prática clínica para auxiliar no manejo dos pacientes com DM (8). No entanto, foi apenas na década de 90 que o verdadeiro valor clínico desta dosagem laboratorial ficou definitivamente estabelecido, a partir de dois grandes ensaios clínicos (3,4) que analisaram o papel do controle intensivo da glicemia no desenvolvimento das complicações crônicas do DM. No estudo *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) (3), o risco para o desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do DM foi intimamente relacionado com o grau do controle glicêmico, medido pela GHb, fração HbA_{1c}. Os resultados do DCCT determinaram a relação dos valores de HbA_{1c} com a glicemia média e estabeleceram objetivos a serem atingidos em pacientes com DM tipo 1. Houve redução no risco de desenvolver retinopatia, microalbuminúria, proteinúria e neuropatia clínica no grupo que foi tratado intensivamente comparado com o

grupo que teve tratamento convencional. Também foi observado um aumento exponencial no desenvolvimento destas complicações com o aumento dos níveis de HbA_{1c} (figura 1).

Os resultados do DCCT foram confirmados pelo *United Kingdom Prospective Diabetes Study* (UKPDS) em 1998 (4), em pacientes com DM tipo 2. Este estudo também mostrou que a intensificação do tratamento da hiperglicemia reduz a incidência das complicações. Para cada 1% de decréscimo absoluto em HbA_{1c}, houve diminuição de 35%, 25% e 7% no risco de complicações microvasculares, mortes relacionadas ao DM e mortes em geral, respectivamente.

Normalmente, estes ensaios clínicos demonstraram que a cada decréscimo absoluto de 1% em HbA_{1c}, há uma redução de 30 a 35% no risco de complicações microvasculares do DM.

Esta mesma relação entre níveis de HbA_{1c} e o desenvolvimento das complicações crônicas do DM também foi observada em outros ensaios clínicos publicados nas últimas décadas (9-16).

Embora a maioria dos estudos não tenha sido primariamente delineada para estabelecer a relação entre controle glicêmico e DCV, análises de subgrupos de dados nas coortes do DCCT e UKPDS mostraram uma associação fortemente sugestiva entre controle glicêmico e doença macrovascular. Na coorte do UKPDS (4), a taxa de eventos cardiovasculares foi alta. Houve uma redução de 18% nos casos de infarto agudo do miocárdio (IAM) no grupo de pacientes que teve tratamento intensivo, mas este achado apresentou significância estatística limítrofe (P= 0,052). Quando o grupo foi observado como um todo, houve uma relação altamente significativa entre HbA_{1c} e o risco de DCV nestes pacientes (15). Apenas um estudo (16) relatou aumento da incidência de doença macrovascu-

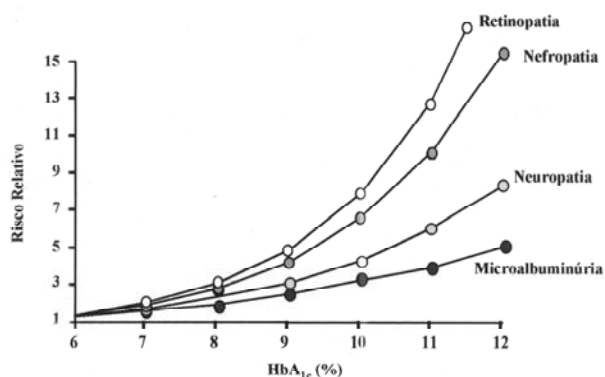


Figura 1. Relação da glico-hemoglobina/HbA_{1c} e risco de complicações microvasculares. Adaptado de Skyler JS. *Endocrinol Metab Clin* 1996;25:243-54.

lar em pacientes com DM2 tratados intensivamente. Neste estudo, o grupo selecionado tinha DM por vários anos. Estes dados sugerem que o efeito do controle glicêmico pode ser diferente em pacientes no estado inicial da doença, como os pacientes do UKPDS, e em pacientes com mais de 10 anos de duração do DM. No entanto, mais estudos são necessários para comprovar esta relação.

Na população de indivíduos não-diabéticos e com DM, níveis mais elevados de GHb/HbA_{1c} também são marcadores de risco cardiovascular, de eventos e mortalidade. A coorte de Norfolk (17) apresentou um aumento no risco de doença macrovascular com o aumento dos níveis de HbA_{1c} nos indivíduos sem DM.

Com base nas evidências acima, pode-se concluir que níveis elevados de GHb/HbA_{1c} estão associados, em todas as populações estudadas, com aumento das complicações do DM, ou seja, a HbA_{1c} é um marcador do risco de complicações no DM. O tratamento dos pacientes com DM deve, portanto, procurar atingir os níveis mais próximos do normal possível da homeostase glicêmica e o grau do controle glicêmico deve ser avaliado pela medida da GHb/HbA_{1c}.

Valor ideal de HbA_{1c}: Qual o objetivo do tratamento?

O tratamento deve ter como objetivo a normalização dos níveis glicêmicos. Baseado nos dados do DCCT e UKPDS (3,4), recomenda-se atingir valores de HbA_{1c} < 7,0% (5,6). Este foi o valor alcançado pelos pacientes tratados intensivamente nos ensaios clínicos e abaixo do qual há uma diminuição considerável das complicações crônicas (figura 1). A ADA recomenda que medidas terapêuticas adicionais devem ser implantadas quando os valores excederem 8,0% (6). Devido a essa última recomendação, muitos clínicos não tratam o DM tão agressivamente como deveriam, e deixam para intensificar o controle glicêmico só quando com valores de HbA_{1c} > 8,0%. Conseqüentemente, os valores de HbA_{1c}, na maioria dos pacientes, estão acima da meta de 7,0% preconizada. Devido a isso, a meta para HbA_{1c} recomendada pela Federação Internacional de Diabetes (IDF *European Policy Group*), com o respaldo do Colégio Americano de Endocrinologia (ACE) (18,19), é 6,5%. O UKPDS mostrou que o risco de ocorrer complicações micro e macrovasculares é maior para os valores de HbA_{1c} > 6,5% (4). Este valor se constituiu de três desvios-padrão (3DP) acima da média de HbA_{1c} para populações não-diabéticas. Estudos indicam que valores mais elevados de HbA_{1c}, ainda

que dentro dos limites normais, já estão associados com desenvolvimento de complicações, principalmente cardiovasculares, em coortes sem diabetes (17).

A Academia Nacional de Bioquímica Clínica Americana (NACB), respaldada pela ADA, recomenda que a determinação de HbA_{1c} seja feita pelo menos duas vezes ao ano em todos os pacientes portadores de DM tipos 1 e 2 (5). Este intervalo deve ser menor, a cada 3 ou 4 meses, para aqueles pacientes que não atingem o controle glicêmico desejável.

Um aspecto importante a ser observado é que muitos pacientes desconhecem a existência do teste A_{1c} e, conseqüentemente, não sabem que existem metas a serem atingidas. Dados norte-americanos (20) revelam que cerca de 40% dos pacientes com DM não tem o teste A_{1c} realizado na freqüência recomendada. Aqueles que têm o teste realizado apresentam níveis > 8% em mais de 50% dos casos. Estes dados não surpreendem, pois os pacientes que foram recrutados para participar da maioria dos ensaios clínicos apresentavam valores de HbA_{1c} ao redor de 9% na época da seleção (3,4).

O conhecimento dos médicos e pacientes sobre o teste tem um papel importante no manejo clínico. Recentemente, campanhas nacionais americanas, promovidas por órgãos públicos e privados, foram lançadas com o objetivo de divulgar o teste e orientar sobre a interpretação dos resultados. A campanha "*The Diabetes A_{1c} Initiative*", promovida pela Associação Americana de Educadores em Diabetes (AADE), foi lançada nacionalmente no Dia Mundial do Diabetes (14 de novembro) do ano passado. Com o lema "*Aim. Believe. Achieve.*", o objetivo da campanha foi alertar e educar os pacientes com DM para alcançar valores de HbA_{1c} < 7% e, com isso, baixar os riscos de complicações do DM.

No Brasil, não existem dados sobre a disponibilidade do teste nos laboratórios. Também não há informação sobre o conhecimento, por parte dos pacientes, da importância e necessidade de se realizar o teste A_{1c}. A Sociedade Brasileira de Diabetes recomenda que o teste A_{1c} seja feito regularmente, no mínimo duas vezes ao ano, e os valores devem ser mantidos no limite superior do intervalo de referência do método utilizado para dosagem (21).

Clínicos e pacientes devem entender bem o significado da GHb/HbA_{1c}, e saber sobre as limitações que envolvem a dosagem, para garantir o valor clínico do teste A_{1c}.

Devido ao impacto das complicações crônicas do DM, para pacientes e sociedade, o teste A_{1c} tem sido utilizado como indicador importante na avaliação e monitoramento da qualidade da assistência aos

pacientes com DM pelas diferentes instituições (5). Informações sobre a frequência com que é solicitado e os níveis alcançados pelos pacientes têm sido requisitadas como forma de garantir que o teste A_{1c} seja utilizado e que as metas recomendadas para o controle glicêmico sejam atingidas.

Reação de Glicação Não-Enzimática e GHb

Em 1955, Kunkel e Wallenius (22) descreveram, pela primeira vez, a heterogeneidade da hemoglobina normal (Hb) em adultos. A seqüência de aminoácidos dos componentes menores, que foram separados por cromatografia, era idêntica ao componente principal (hemoglobina A₀). Estudos posteriores (23) identificaram subfrações que eluíam mais rápido que HbA₀, e foram coletivamente chamadas de Hb “rápidas” e nomeadas, individualmente, como HbA_{1a}, HbA_{1b} e HbA_{1c}, conforme a ordem de eluição da coluna. Rahbar e cols. (24) mostraram que estas frações estavam elevadas nos eritrócitos de pacientes com DM. Em 1971, pela primeira vez, foi descrita a relação entre as hemoglobinas rápidas, a glicemia média e as complicações crônicas de pacientes com DM (7).

A formação da GHb ocorre via uma reação de glicação não-enzimática entre o grupo aldeído livre da glicose, ou outros açúcares, e um grupo amino livre na molécula da hemoglobina. Esta reação é conhecida como reação de Maillard. A reação envolve a formação de um composto intermediário instável (base de Schiff, aldimina ou fração lábil), que se forma rapidamente e é proporcional à concentração de glicose momentânea (25). Este composto sofre, lentamente, o rearranjo de Amadori e forma uma cetamina estável e irreversível (proteína glicada/GHb).

Existem vários sítios de glicação na molécula de hemoglobina. O resíduo terminal de valina na cadeia α corresponde a aproximadamente 60-80% da glicose ligada. Outros sítios de ligação também ocorrem na cadeia α . Outros açúcares podem se ligar à molécula e contribuem para a fração total glicada (HbA₁). O componente especificamente ligado à glicose é conhecido como HbA_{1c} (26).

A natureza heterogênea da GHb tem gerado confusão na nomenclatura e no componente que está sendo medido por um determinado método. A *International Federation of Clinical Chemistry* – IFCC (27) define GHb como o termo genérico para denominar os componentes menores da hemoglobina. O termo inclui todas as hemoglobinas modificadas com a glicose ou outros açúcares, incluindo HbA₁ e suas frações HbA_{1a}, HbA_{1b}, HbA_{1c} e HbA_{1d}, bem como as outras hemoglobinas anômalas glicadas (HbS, HbF, HbC)

que, eventualmente, possam estar presentes. As espécies mais conhecidas de GHb são HbA₁, HbA_{1c} e GHb total (todas as frações ligadas a um açúcar, em qualquer sítio da cadeia de Hb, inclusive as Hb anômalas). Recentemente, baseados nos dados do DCCT e UKPDS (3,4), que usaram métodos que mediam especificamente HbA_{1c}, o termo “teste A_{1c}” tem sido recomendado (5,6,28).

Relação da Glicose e GHb

A glicação não-enzimática da hemoglobina é determinada principalmente por três fatores: concentração média da glicose plasmática, tempo de meia-vida da hemácia e permeabilidade da membrana do eritrócito à glicose. A membrana de eritrócitos humanos é livremente permeável à glicose (29). Sendo assim, a concentração plasmática de glicose e o tempo de meia-vida da hemácia são os principais determinantes da reação de glicação da proteína em seres humanos. Como a meia-vida dos eritrócitos é, em média, até 120 dias, podemos dizer que a GHb é um índice da média da glicemia nos 120 dias que precedem à coleta do material para o teste laboratorial. A GHb reflete, mais especificamente, o controle glicêmico dos meses que precederam a dosagem.

A relação da glicose e GHb é complexa e não pode ser explicada por um simples cálculo matemático. Modelos matemáticos e dados clínicos (3,30-32) mostram que a média glicêmica dos 20-30 dias anteriores à coleta da amostra contribui com aproximadamente 50% do resultado final, e que os 90-120 dias precedentes contribuem com apenas 10%. Isso significa que o valor de HbA_{1c}, em qualquer momento, tem a contribuição de todos os eritrócitos: velhos (120 dias de idade) e novos. No entanto, os níveis recentes de glicose (1-2 meses anteriores) contribuem mais para o resultado final. Devido a isso, a GHb pode detectar grandes variações da glicemia em pequenos períodos de tempo, como 3 a 4 semanas. É possível detectar mudanças clinicamente relevantes nos valores de HbA_{1c} sem precisar esperar 120 dias após os supostos episódios hiperglicêmicos.

Estudos cinéticos na formação da GHb (30) sugerem que a reação de glicação da Hb é uma reação de primeira ordem e ocorre em condições de equilíbrio. O tempo requerido para se alcançar um ponto médio entre o valor inicial e um novo valor é relativamente constante em 30-35 dias.

Os dados do DCCT (3) proporcionaram informações importantes sobre a complexa relação entre glicemia média e GHb. Existe uma forte correlação entre glicemia e GHb ($r = 0,81$, $P < 0,0001$) e, para

cada 1% de variação da GHb (%HbA_{1c}), há uma variação de 35mg/dL da glicemia média (32). Esta relação originou-se da análise de mais de 26.000 resultados de HbA_{1c} de 1439 pacientes da coorte do DCCT. Em média, foram analisados 18 valores de HbA_{1c} para cada paciente e seus perfis glicêmicos correspondentes (7 pontos de glicemia – antes das refeições, 90 minutos após as refeições e antes de dormir). Estes dados mostraram que a relação GHb e Glicemia é previsível e pode ser resumida pela equação: Glicose (mg/dL) = (1,98%HbA_{1c} – 4,29) / 0,056. Esta relação pode ser utilizada para se ter uma idéia aproximada dos valores de glicose apropriados para cada paciente, para que os valores de GHb recomendados possam ser alcançados e mantidos na prática (tabela 1). A correlação entre os valores de HbA_{1c} e glicemia de jejum foi menor (r= 0,69) do que a encontrada para HbA_{1c} e glicemia média estimada pelo perfil glicêmico de sete pontos. Os valores elevados de glicose de jejum subestimam os valores de HbA_{1c}. Os níveis glicêmicos pós-refeições apresentam uma melhor correlação com os valores de HbA_{1c}. Níveis pós-desjejum tendem a superestimar HbA_{1c}, enquanto que as glicemias pós-almoço apresentam uma relação similar àquela da glicemia média determinada pelo perfil glicêmico (32).

Em pacientes tipo 2, a relação entre glicemia e HbA_{1c} parece ser mais complexa (33). Em geral, os níveis glicêmicos, durante diferentes períodos do dia, apresentam uma correlação menor do que a encontrada para pacientes tipo 1, sendo que os níveis pré-refeição foram os mais relacionados com os níveis de HbA_{1c}. Em DM tipo 2, HbA_{1c} parece fornecer pouca informação sobre os níveis pós-prandiais e, conseqüentemente, pode não ser um bom índice para as variações dos níveis glicêmicos após as refeições. Devido a isso, há sugestões de que o monitoramento de pacientes com DM2 seja feito através de medidas de glicemias de

jejum, HbA_{1c} e também de medidas glicêmicas pós-prandiais (33). Esta relação em pacientes tipo 2 precisa ser melhor estudada.

Na prática, os pacientes que mantiverem seus níveis glicêmicos médios ao redor de 170mg/dL (9,5mmol/L) alcançarão o valor-alvo de 7% recomendado para HbA_{1c}. Aqueles pacientes com glicemias > 200mg/dL (11,1mmol/L) necessitarão ação adicional no tratamento. A determinação da glicemia não substitui o teste A_{1c}, mas pode dar uma idéia do valor da A_{1c} no acompanhamento ambulatorial dos pacientes. Precauções devem ser tomadas na interpretação destas relações. Os dados são válidos apenas quando métodos similares ao usado pelo DCCT, ou métodos DCCT alinhados/convertidos, são utilizados para a dosagem de HbA_{1c} (5).

Métodos para Dosagem da GHb

Existem mais de 30 métodos diferentes para a dosagem de GHb disponíveis para uso no laboratório clínico (5,34). Eles medem a GHb baseados nas diferenças físicas, químicas ou imunológicas entre a fração glicada (HbA₁ ou HbA_{1c}) e a não-glicada HbA₀ (figura 2).

De uma maneira geral, os métodos podem ser classificados em dois grandes grupos (tabela 2):

Métodos Baseados na Diferença de Carga Elétrica Entre GHb e HbA₀

A cromatografia de troca catiônica (HPLC e minicolunas) e a eletroforese usam este princípio. O princípio baseia-se no fato de que a ligação da glicose, ou de outro açúcar, ao amino grupo terminal da cadeia α altera a carga total da hemoglobina, fazendo com que a fração glicada migre mais rápido em um campo elétrico ou em resinas de troca iônica, permitindo a separação das frações.

As minicolunas cromatográficas invadiram os laboratórios clínicos na década de 80 por serem baratas e de fácil acesso. Estes métodos são pH e temperatura dependentes, apresentam problemas de calibração e baixa reprodutibilidade (35). Por não possuírem resolução suficiente para separar as frações glicadas, eles medem a fração glicada total (HbA₁). Nos últimos anos, eles têm sido substituídos por sistemas de HPLC mais robustos e automatizados (35-38). O método de HPLC por troca iônica foi utilizado pelo DCCT (3) e é recomendado como método de referência interino para a dosagem de GHb até que os órgãos internacionais decidam sobre o método de referência definitivo (27,39).

Métodos Baseados em Ligações Específicas

Esses métodos usam a diferença estrutural ou química

Tabela 1. Valores aproximados de glicemia média e os valores correspondentes de HbA_{1c} para uso clínico.

HbA _{1c} (%)	Glicemia Média	
	(estimada pelo perfil de 7 pontos) mg/dL	(estimada pela glicemia de jejum) mg/dL
4	65	85
5	100	112
6	135	139
7*	170	166
8	205	193
9	240	220
10	275	248
11	310	275
12	345	302

* valor máximo recomendado pela ADA. Adaptado de Rohlfing CL, et al (ref. 32).

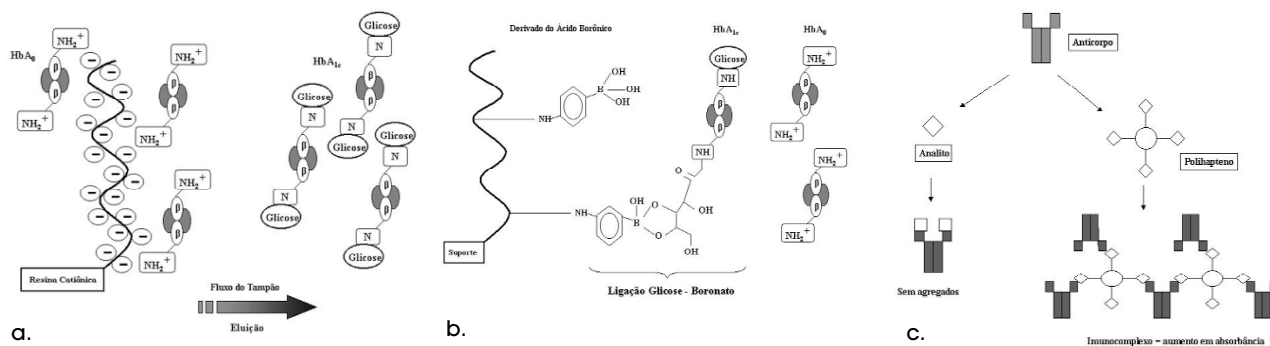


Figura 2. Princípio dos métodos utilizados para dosar GHB: a) troca iônica; b) afinidade; c) imunoensaio.

Tabela 2. Métodos para dosagem de glico-hemoglobina no laboratório clínico. *

Princípio Geral	Método	Princípio específico	Tipo de GHB dosada	Principais Interferentes	CV (%) Interensaio	Certificação NSGP	Marcas Comerciais Disponíveis
Separação por diferença de carga das frações	Minicoluna – Troca Iônica	HbA _{1c} , menos positiva em pH neutro, liga-se mais fracamente à coluna e elui primeiro	HbA ₁	HbF e outras Hb Lipemia/Ictericia Temperatura Fração lábil Uremia pH	> 10	Não	Labtest ** Biodiagnóstica ** Doles Biosystem
	HPLC – Troca Iônica	Frações glicadas são eluídas por gradiente de pH	HbA ₁ A _{1α} A _{1β} A _{1c} Lábil (?)	HbF e outras Hb Uremia/Aspirina Vitamina C (?) Vitamina E (?)	< 5	Sim	Biorad Variant I e II TOSOH Hitachi Menarini
	Eletroforese	Migração em campo elétrico: HbA _{1c} é mais lenta devido à glicose	HbA ₁ A _{1c}	Uremia HbF	5 – 10	Sim	Beckman Sebia Helena
Separação por ligação a compostos específicos	Cromatografia por Afinidade	Afinidade com ácido amino fenilborônico (HPLC e minicolunas)	GHB Total	?	< 5	Sim	Primus HPLC Pierce e Isolab Minicolunas
	Afinidade/Captura iônica	Afinidade + captura iônica + fluorescência	GHB Total	?	5 – 6	Sim	IMX Abbot
	Imunoenaios	Imunoturbidimetria (IT) Imunoaglutinação (IA)	HbA _{1c} (S _{1c} , C _{1c} , D _{1c})	?	6 – 8	Sim	TinaQuant Roche Dade Bering Dimension DCA Bayer Metrika

* Métodos referência IFCC não são aplicados para uso na rotina e não constam na tabela.

** Teste disponível apenas no Brasil.

entre GHB e HbA₀ para separar as frações.

Cromatografia de afinidade: baseia-se na reação específica dos grupos 1,2 cis-diol, resultantes da ligação da hemoglobina com a molécula de glicose, com o ácido fenilborônico ou derivados. Nestes métodos, a GHB liga-se à coluna ou ao suporte contendo o boronato e a fração HbA₀ elui primeiro. As variações de temperatura e pH, presença de Hb anômalas, uremia e fração lábil não afetam estes métodos. (40).

Métodos imunológicos: usam anticorpos dire-

cionados ao N-terminal glicado da hemoglobina (seqüências que variam de 3 a 8 aminoácidos) e são específicos para a fração HbA_{1c}, sendo que os resultados são expressos com porcentagem de HbA_{1c}. A grande vantagem destes ensaios é a facilidade de automatização em autoanalisadores bioquímicos comuns. Ensaios utilizando imunoturbidimetria (41) e imunoaglutinação estão disponíveis no mercado (42).

Com a popularização do teste A_{1c}, esta modalidade de ensaio tem sido recentemente utilizada para

desenvolver testes rápidos para monitoramento do paciente em casa ou no consultório médico na hora da consulta (*point of care testing* – POCT). Estes métodos utilizam sangue capilar e cassetes descartáveis que contêm o conjunto reativo (42,43). Os resultados são disponibilizados em menos de 10 minutos e apresentam uma boa correlação e concordância com os resultados dos métodos tradicionalmente usados no laboratório clínico. Uma desvantagem é o custo elevado de, aproximadamente, 15 a 25 dólares por teste.

Método Enzimático: recentemente foi descrito um método que utiliza proteases para digerir a hemoglobina produzindo “frutosil-aminoácido” (44). Pela ação de uma oxidase, este composto produz peróxido de hidrogênio, que reage com cromogênios na presença de peroxidase. A hemoglobina total é medida espectrofotometricamente e o resultado é dado como a relação GHb/Hb total.

O Brasil ainda não possui um programa externo da qualidade específico para GHb. A participação em programas internos e externos, para garantir a qualidade de todos os resultados, é uma exigência dos órgãos fiscalizadores para a obtenção de Certificado de Acreditação para o laboratório clínico. Apesar disso, os dois maiores Programas Externos para Garantia da Qualidade, gerenciados pela Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC – PELM) e Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC – Control-Lab) ainda não contemplam o parâmetro GHb (45,46). A SBPC – PELM está programando, para 2004, a primeira remessa de controles para análise de GHb.

Padronização e Harmonização dos Resultados

Em geral, métodos utilizando diferentes princípios de ensaio apresentam excelente correlação, e não existem dados suficientes para mostrar se um ou outro método, ou fração, tem valor clínico superior. No entanto, os valores de GHb/HbA_{1c} fornecidos por um laboratório podem não corresponder com os valores fornecidos por outro laboratório, mesmo usando o mesmo método e medindo a mesma fração. Não existe concordância entre os valores de referência e a comparação dos resultados é muito difícil (5,35,47-49). A mesma amostra pode apresentar um valor de 7% em um laboratório e 9% em outro. A carência de padronização limita o uso destes métodos. Apesar do uso de fórmulas de conversão, oriundas de estudos comparativos, ser uma prática largamente adotada, a validade desta ferramenta para padronização dos resultados de GHb depende do método originalmente utilizado. Em um estudo prévio (35), relatamos que as

fórmulas de conversão, baseadas em métodos que não medem a fração HbA_{1c} (como as minicolunas de troca iônica, métodos baseados em afinidade e eletroforese), têm uma variabilidade que pode resultar em diferenças absolutas maior que 1% do valor verdadeiro. Esta variação pode mascarar uma verdadeira, e clinicamente relevante, diferença em níveis de HbA_{1c}. Os métodos com baixa reprodutibilidade inferem um grande erro nos resultados convertidos. No entanto, quando métodos precisos são utilizados, o erro na conversão dos resultados é muito menor e aceitável para uso clínico.

A preocupação com a padronização dos métodos para GHb foi intensificada no início da década de 90, com a previsão dos resultados finais do DCCT(49). Desde 1984, o *National Diabetes Data Group* (NDDG) reconhecia a necessidade de padronização, e grupos de estudo discutiam o problema (50). Em 1991, mudanças foram feitas no programa externo de qualidade para GHb do *College of American Pathologists* (CAP) para permitir uma melhor avaliação da variação interlaboratorial e exatidão dos resultados. Os métodos foram divididos por categorias, e a GHb medida por cada laboratório foi especificada (HbA_{1c}, A_{1c} ou GHb total). Foi o primeiro mapeamento da situação, e um programa piloto de padronização foi proposto (51). Outros estudos foram realizados e mostraram que a padronização era viável (52-55).

Após a publicação dos resultados do DCCT (3), preocupados com o impacto clínico dos resultados de GHb no manejo do paciente diabético, vários comitês internacionais trabalharam na padronização e unificação dos resultados de GHb (47,56,57). O *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) (39), patrocinado pelas Associações Americanas de Diabetes (ADA) e de Química Clínica (AACC), começou, em 1996, a comparar e certificar os diferentes métodos utilizados para dosar GHb, com o intuito de relacionar os diferentes valores de GHb obtidos com os valores de HbA_{1c} do DCCT. O centro de referência é o laboratório que participou como laboratório central do DCCT na Universidade de Missouri. O objetivo principal do NGSP é certificar os métodos a nível de fabricantes, mas laboratórios podem também obter certificação a nível de laboratório de referência (nível 1) ou clínico (nível 2). O programa inclui a análise e monitoramento da precisão e desvio, considerando o método do DCCT como referência. Os critérios para certificação são: CV < 5% (< 3% para Laboratórios de Nível 1) e um erro de ± 5% para os valores estabelecidos pelo laboratório central (valores DCCT). Desta maneira, cada método ou laboratório pode informar os resultados de GHb em %

HbA_{1c} diretamente comparáveis com os do DCCT. O sucesso desta iniciativa está implícito no grande número de métodos certificados e na pequena variação interlaboratorial obtida pelos métodos certificados nos programas externos de garantia da qualidade (58).

A descrição de novas técnicas para dosagem da GHb, como a espectrometria de massa e técnicas moleculares recombinantes, levaram alguns grupos a estudar propostas de métodos de referência (59-61). A Federação Internacional de Bioquímica Clínica (IFCC) aprovou recentemente um método de referência para GHb (27). O método é baseado em clivagem da GHb em peptídeos específicos, separação por HPLC de troca iônica e identificação por espectrometria de massa ou por eletroforese capilar. A correlação entre resultados do IFCC e NGSP é excelente, porém os valores absolutos são diferentes. Em média, os valores IFCC são 1,6% HbA_{1c} mais baixos que os valores do NGSP e, conseqüentemente, do que os do DCCT (58). Os resultados do IFCC são baseados na exatidão analítica, e os resultados dos métodos certificados pelo NGSP são baseados em evidências clínicas. Estudos da relação dos resultados do IFCC e DCCT estão em andamento para saber quais valores devem ser utilizados. O impacto da mudança de valores no manejo clínico será grande. Enquanto os órgãos internacionais não chegam a um acordo, o NGSP continuará certificando os métodos de GHb e incluirá o método do IFCC como um dos métodos âncora da rede de laboratórios do programa. Os programas externos de garantia da qualidade da Europa já estão informando os resultados de GHb IFCC, juntamente com os valores DCCT/NGSP.

No Brasil, alguns grupos trabalham na conscientização da importância dos resultados de HbA_{1c}, mas pouco tem sido feito para padronizar os resultados (62). Em um estudo piloto recente (63) realizado no estado do Rio Grande do Sul, os métodos utilizados pelos laboratórios foram mapeados e classificados por

grupos (tabela 3). A realidade dos laboratórios clínicos do sul do país é muito diferente da realidade internacional. Apenas 23,6% dos laboratórios avaliados usam métodos certificados pelo NGSP, e 76,4% utilizam métodos não certificados e não podem ter seus resultados comparados aos resultados do DCCT. O método de microcromatografia de troca iônica é o mais utilizado entre os laboratórios do Rio Grande do Sul (71,9%), apresentando, nas diferentes marcas comerciais, uma grande variação entre resultados.

Fatores que Afetam os Resultados

Dependendo dos métodos utilizados, muitos fatores podem afetar ou interferir nos resultados. Os fatores mais conhecidos são a fração lábil e a conservação da amostra (64-66). Estes estudos são antigos e há carência de dados recentes que possam ser aplicados aos novos métodos e equipamentos disponíveis no mercado.

Recentemente, relatamos o efeito destas variáveis nas dosagens de GHb (67). A fração lábil é uma importante contribuição, quando não é adequadamente eliminada ou quantificada pelo método que está sendo usado, nos valores de HbA_{1c}. Em nosso estudo, utilizando um método de HPLC, as amostras que não apresentaram pico definido para a fração lábil no cromatograma foram superestimadas em até 1,64% de HbA_{1c}. Como uma maneira prática de evitar esta interferência, propomos um pré-tratamento da amostra, que consiste de incubação do sangue total por 6h a 37°C, para eliminação desta fração lábil. Em relação ao armazenamento das amostras, verificamos que as amostras que são mantidas sob refrigeração (4°C) apresentam estabilidade por 10 dias, e o armazenamento sob -20°C subestima significativamente a concentração de HbA_{1c}, independente do tempo de armazenamento. As amostras mantidas sob -80°C são estáveis até 3 meses. Sugerimos que as amostras que não podem ser imediatamente analisadas sejam manti-

Tabela 3. Métodos para determinação de HbA_{1c}/glico-hemoglobina utilizados por laboratórios clínicos do Rio Grande do Sul.

Grupo	Método	Laboratórios (N = 89)	Marca	Princípio	Valor de Referência (%)	Certificação NGSP
1	Mini Coluna	32	Labtest	Troca iônica	5,3 - 8,0	Não
2	Mini Coluna	11	Katal	Troca iônica	5,0 - 7,0	Não
3	Mini Coluna	10	Biodiagnóstica	Troca iônica	6,0 - 8,0	Não
4	Mini Coluna	6	Biosystems	Troca iônica	6,0 - 8,0	Não
5	Mini Coluna	4	Doles	Troca iônica	4,5 - 8,0	Não
6	Mini Coluna	1	Biobrás	Troca iônica	4,5 - 7,0	Não
7	Imuno-turbidimetria	14	Roche	Imunológico	4,8 - 6,0	Sim
8	HPLC/LPC	7	Biorad	Troca iônica	4,0 - 6,4	Sim
9	Eletroforese	4	Celm	Troca iônica	6,0 - 9,2	Não

* N=89

das sob refrigeração por até 10 dias, e que o armazenamento a longo prazo deve ser feito a -80°C . Mais estudos são necessários para explicar o fato surpreendente de que amostras estocadas a -20°C perdem a estabilidade já no primeiro dia de armazenamento.

Além destas variáveis pré-analíticas, algumas doenças e estados patológicos, como anemias, dislipidemias, e alguns medicamentos podem alterar significativamente os resultados de GHb (5,6).

A presença de hemoglobinas (Hb) anômalas é considerada um importante fator de interferência positiva ou negativa nas dosagens de GHb, independente do método utilizado (68). Relatos de diferentes interferências, em diferentes métodos, têm sido publicados nos últimos anos (69-74), enfatizando que cada laboratório deve ter conhecimento da influência das hemoglobinopatias no método que está sendo empregado. A interferência das hemoglobinas anômalas é maior nos métodos com base na separação de cargas, como HPLC de troca catiônica. Alguns métodos de HPLC identificam e quantificam as Hb variantes, outros podem apenas expressar resultados muito baixos ou altos (68). Os métodos imunológicos parecem não ser afetados por esta interferência. Em geral, os anticorpos anti-HbA_{1c} utilizados nos ensaios reconhecem os 3-5 primeiros aminoácidos do N-terminal da cadeia α que está ligado à glicose. Esta seqüência inicial é igual para a HbA e as Hb variantes comuns.

Como a concentração de GHb depende da meia-vida normal dos eritrócitos (5,6), doenças hemolíticas ou outras condições que encurtam a sobrevivência das células reduzem significativamente os níveis de GHb. O papel da anemia nos níveis de GHb tem sido pouco estudado. Provavelmente, pacientes com diferentes tipos de anemia apresentem níveis reduzidos de GHb e, uma vez corrigida a anemia, tenham os valores de GHb aumentados. Este fato pode estar relacionado com aqueles pacientes que apresentam um controle glicêmico, medido pela GHb, em desacordo com a história clínica ou glicemia. Alguns estudos mostram que as anemias deficientes de ferro e de vitamina B₁₂ alteram os níveis de GHb (75-77). É provável que anemias por outras causas, como as de doenças crônicas, afetem os resultados de GHb da mesma forma.

Recentemente (78), estudamos as condições associadas com os valores muito baixos de GHb. Em um grupo de 130 pacientes que apresentaram valores de GHb abaixo do limite inferior do intervalo de referência do método de HPLC utilizado, a presença de hemoglobinas anômalas foi observada em 56% (73 pacientes). Estes pacientes não apresentavam sinais ou sintomas de hemoglobinopatias, a maioria era branca,

e a eletroforese de Hb revelou que todos eram heterozigotos para Hb S, C ou D. Considerando a heterogeneidade étnica da população brasileira, estes dados mostram-se relevantes na interpretação do controle glicêmico de pacientes com DM. Neste mesmo estudo, os valores muito baixos de GHb também foram relacionados com a presença de anemia. Na ausência de Hb variantes, a anemia foi observada em 35% dos pacientes que apresentaram valores muito baixos de GHb. Estes dados sugerem que diferentes graus de anemia podem estar associados a valores mais baixos de GHb. Isto pode ser devido a pequenas alterações no tempo de meia-vida das hemácias ou na velocidade de formação da GHb, ocasionando uma diminuição aparente dos níveis de GHb.

A Hb carbamylada, resultado da reação da Hb com a uréia em pacientes urêmicos (uremia $> 160\text{mg/dL}$), pode ser uma fonte significativa de erro nas dosagens de GHb. Estudos divergem quanto à significância clínica e à magnitude desta interferência, que é dependente do método que está sendo utilizado (79-81).

A ação de drogas, como a aspirina, na formação e determinação da GHb tem sido estudada (79,82,83). A aspirina pode levar à formação de um derivado de Hb “acetilado”, o qual, devido à sua carga elétrica, migra junto com a GHb naqueles métodos que baseiam-se na diferença de carga para a dosagem de GHb, resultando em valores falsamente elevados. Em um destes estudos (82), foi demonstrado que a ingestão de aspirina acarreta um aumento aparente de GHb. Outros dois estudos (79,83) não encontraram diferenças nos valores de GHb após ingestão de aspirina. Da mesma forma que a interferência pelas Hb anômalas e pela uremia, a interferência da aspirina é método-dependente. O consumo abusivo de álcool, semelhante à aspirina, pode levar à formação do mesmo derivado “acetilado”, interferindo também nas dosagens de GHb (83).

Em paralelo, o uso prolongado de vitamina C e E também tem sido estudado como possível fonte de interferência negativa nas dosagens de GHb (84-86). O estresse oxidativo é apontado como uma provável causa do aparecimento das complicações do DM. Oxidantes e anti-oxidantes têm um papel importante na terapia destas complicações. Vitaminas C, E e α -carotenos têm sido usados como anti-oxidantes em pacientes com DM (87). A suplementação de vitamina E e C melhora o controle glicêmico de pacientes com DM (88-90). Recentemente (91), foi relatado que os níveis de GHb podem ser modificados pela dieta ou pelo estilo de vida em indivíduos normais. O consumo de álcool, vitamina C e E foi relacionado com o risco

de indivíduos não-diabéticos apresentarem níveis mais baixos de GHb. Todavia, os resultados destes estudos são contraditórios e não está claro, até o momento, se o uso das vitaminas C ou E altera verdadeiramente os valores de GHb devido a uma inibição na glicação proteica ou se este efeito é devido a outros fatores, não relacionados à glicação, mas à formação de produtos derivados, que podem causar erros metodológicos.

Em um ensaio clínico randomizado e controlado (67), estudamos o efeito de doses usuais de aspirina, vitamina C e vitamina E nos níveis de HbA_{1c}, medidos por três métodos diferentes, dois sistemas de HPLC e um imunoensaio, em um grupo de voluntários não-diabéticos. O tratamento com vitaminas C ou E, em doses farmacológicas, não tem nenhum impacto nos níveis de GHb de indivíduos não-diabéticos, quando determinados pelos métodos empregados no estudo. A aspirina induz um modesto aumento nos níveis de GHb. Mais estudos são necessários para confirmar este efeito em pacientes com DM.

Comentários Finais

Os estudos que avaliaram o papel do controle glicêmico no desenvolvimento das complicações diabéticas (3,4,92) mostraram que redução absoluta de 1% em HbA_{1c} determinou uma redução significativa no desenvolvimento ou progressão das complicações crônicas, como retinopatia, nefropatia e doenças cardiovasculares. Estima-se que mais de 5 milhões de brasileiros tenham diabetes (1). O tratamento das complicações crônicas consome parte significativa do orçamento destinado à assistência médica.

Devido ao grande número de fatores que podem afetar os diferentes métodos, cada laboratório deve estar atento às fontes de erros que podem alterar seus resultados de GHb. Embora a maioria destas interferências esteja relatada na literatura internacional, os resultados dos estudos são contraditórios. Outro aspecto importante a ser mencionado é que as interferências são dependentes dos métodos empregados para realizar as dosagens. Uma interferência pode ocorrer em uma magnitude clinicamente significativa em um método e ser negligível em outro.

Os laboratórios clínicos devem estar preparados para fornecer resultados exatos e precisos de GHb/HbA_{1c}, para ajudar o clínico a prevenir e manejar as complicações do DM.

REFERÊNCIAS

1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso, detecção

e tratamento das complicações crônicas do diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab** 1999;43:7-13.

2. Costa L, Canani LH, Lisbôa HR, Tres GS, Gross JL. The aggregation of metabolic syndrome features is associated with increased prevalence of chronic complications in type 2 diabetes. **Diabetic Med** 2004; (in press).
3. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1993;329:977-86.
4. U.K. Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group: Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). **Lancet** 1998;352:837-51.
5. Sacks DB, Bruns DE, Goldstein DE, et al. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem** 2002;48:436-72.
6. American Diabetes Association Clinical Practice Recommendation. Tests of glycemia in diabetes. **Diabetes Care** 2003;26(suppl. 1):S106-S108.
7. Trivelli LA, Ranney HM, Lai HT. Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1971;284:353-7.
8. Nathan DM, Singer DE, Hurxthal K, Goodson JD. The clinical information value of the glycosylated hemoglobin assay. **N Engl J Med** 1984;310:341-6.
9. Dahl-Jorgensen K, Bjoro T, Kierulf P, Sandvik L, Bangstad HJ, Hanssen KF. Long-term glycemic control and kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. **Kidney Int** 1992;41:920-3.
10. Reichard P, Nilsson BY, Rosenqvist U. The effect of long-term intensified insulin treatment on the development of microvascular complications of diabetes mellitus. **N Engl J Med** 1993;329:304-9.
11. Ohkubo Y, Kishikawa H, Araki E, et al. Intensive insulin therapy prevents the progression of diabetic microvascular complications in Japanese patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus: a randomized prospective 6-year study. **Diabetes Res Clin Pract** 1995;28:103-17.
12. Wu MS, Yu CC, Yang CW. Poor predialysis glycaemic control is a predictor of mortality in type II diabetic patients on maintenance hemodialysis. **Nephrol Dial Transplant** 1997;12:2105-10.
13. Ravid M, Brosh D, Ravid-Safran D. Main risk factors for nephropathy in type II diabetes mellitus are plasma cholesterol levels, mean blood pressure, and hyperglycemia. **Arch Intern Med** 1998;158:998-1004.
14. Klein R. Hyperglycemia and microvascular and macrovascular disease in diabetes. **Diabetes Care** 1995;18:258-68.
15. Stratton IM, Adler AI, Neil HA, et al. Association of glycaemia with macrovascular and microvascular complications of type 2 diabetes (UKPDS 35): prospective observational study. **BMJ** 2000;321(7258):405-12.
16. Abaira C, Colwell JA, Nuttall FQ, et al. Veterans Affairs

- Cooperative Study on glycemic control and complications in type II diabetes (VA CSDM): results of the feasibility trial. **Diabetes Care** 1995;18:1113-23.
17. Khaw KT, Wareham N, Luben R, et al. Glycated haemoglobin, diabetes, and mortality in men in Norfolk cohort of European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition (EPIC-Norfolk). **BMJ** 2001;322:15-8.
 18. Standl E. International Diabetes Federation European Policy Group Standards for Diabetes. **Endocrine Prac** 2002;8(suppl. 1):37-9.
 19. American College of Endocrinology Consensus Statement on Guidelines for Glycemic Control. **Endocrine Prac** 2002;8(suppl. 1):6-11.
 20. Davidson JA. Rationale for more aggressive guidelines for diabetes control. **Endocrine Prac** 2002;8(suppl. 1):13-4.
 21. Sociedade Brasileira de Diabetes. Consenso Brasileiro sobre Diabetes. Maio 2000. <http://www.diabetes.org.br/consenso/index.html>. Acessado em Julho 2003.
 22. Kunkel GH, Wallenius G. New hemoglobins in normal adult blood. **Science** 1955;122:288.
 23. Allen DW, Schroeder WA, Balog J. Observations on chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal hemoglobin: a study of the effect of crystallization and chromatography heterogeneity and isoleucine content. **J Am Chem Soc** 1958;80:1628-32.
 24. Rahbar S, Blumenfeld D, Ranney HM. Studies of unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. **Biochem Biophys Res Commun** 1969;36:838-43.
 25. Bunn HF, Hanney DN, Kamin S, et al. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. **J Clin Invest** 1976;57:1652-9.
 26. Peterson KP, Pavlovich JG, Goldstein D, et al. What is hemoglobin A_{1c}? An analysis of glycated hemoglobins by electrospray ionization mass spectrometry. **Clin Chem** 1998;44:1951-8.
 27. Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA_{1c} in human blood. **Clin Chem Lab Med** 2002;40:78-89.
 28. Levetan CS. Hemoglobin A_{1c}: Need to standardize the term. **Endocrine Pract** 2002;8:25-6.
 29. Higgins PJ, Garlick RL, Bunn HF. Glycosylated hemoglobin in human and animal red cells: Role of glucose permeability. **Diabetes** 1982;31:743-8.
 30. Goldstein DE, Little RR, Wiedmeyer HM, England JD, Rohlfing CL. Glycohemoglobin testing in diabetes mellitus: assay methods and clinical interpretation. In: Vasseli JR, Maggio CA, Scriabine A, eds. **Drugs in Development**. Vol I. Brandford: Neva Press, 1993. p. 253-67.
 31. Mortensen HB, Volund A, Christophersen V. Glycosylation of human haemoglobin A. Dynamic variation in HbA_{1c} described by a biokinetic model. **Clin Chim Acta** 1984;136:75-81.
 32. Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Little RR, et al. Defining the relationship between plasma glucose and HbA_{1c}. Analysis of glucose profiles and HbA_{1c} in the Diabetes Control and Complications Trial. **Diabetes Care** 2002;25:275-8.
 33. Bonora E, Calcaterra F, Lombardi S, et al. Plasma glucose levels throughout the day and HbA_{1c} interrelationships in type 2 diabetes. **Diabetes Care** 2001;24:2023-9.
 34. Schwartz JG. The role of glycohemoglobin and other proteins in diabetes management. **Diabetes Rev** 1995;3:269-87.
 35. Camargo JL, Zelmanovitz T, Paggi A, Friedman R, Gross JL. Accuracy of conversion formulae for estimation of glycohemoglobin. **Scand J Clin Lab Invest** 1998;58:521-8.
 36. John WG, Braconnier F, Miedema K, Aulesa C, Piras G. Evaluation of the Menarini-Akray HA8140 hemoglobin A_{1c} analyzer. **Clin Chem** 1997;43:968-75.
 37. Gibb I, Parnham A, Fonfrede M, Lecock F. Multicenter evaluation of Tosoh glycohemoglobin analyzer. **Clin Chem** 1999;45:1833-41.
 38. Higgins TN, Blakney GB, Dayton J. Analytical evaluation of the Bio-Rad Variant II automated HbA_{1c} analyzer. **Clin Biochem** 2001;34:361-5.
 39. Little RR, Rohlfing CL, Wiedmeyer HM, Myers GL, Sacks DB, Goldstein D. The National Glycohemoglobin Standardization Program: A five-year report progress. **Clin Chem** 2001;47:1985-92.
 40. Klenk DC, Hermanson GT, Krohn Ri, et al. Determination of glycosylated hemoglobin by affinity chromatography: comparison with colorimetric and ion-exchange methods, and effects of common interferences. **Clin Chem** 1981;28:2088-94.
 41. Wilson DH, Bogacz JP, Forsythe CM, et al. Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott Imx Analyzer: novel approaches for separation and detection. **Clin Chem** 1993;39:2090-7.
 42. John WG, Edwards R, Price CP. Laboratory evaluation of the DCA 2000 clinic HbA_{1c} immunoassay analyser. **Ann Clin Biochem** 1994;31:367-70.
 43. Stivers CR, Baddam SR, Clark AL, et al. A miniaturized self-contained single-use disposable quantitative test for hemoglobin A_{1c} in blood at the point of care. **Diabetes Technol Ther** 2000;2:517-26.
 44. Sakurabayashi I, Watano T, Yonehara S, et al. New enzymatic assay for glycohemoglobin. **Clin Chem** 2003;49:269-74.
 45. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica. Proficiência em Ensaios Laboratoriais - PELM. <http://www.control-lab.com.br/>. Acessado em Julho 2003.
 46. Sociedade Brasileira de Análises Clínicas. Programa Nacional de Controle de Qualidade de Laboratórios Clínicos - PNCQ. <http://www.pncq.org.br/>. Acessado em Julho 2003.
 47. Turpeinen U, Karjalainen U, Stenman U. Three assays for glycohemoglobin compared. **Clin Chem** 1995;41:191-5.
 48. Gilbert RE, Goodall I, Young V, Jerums G. Interlaboratory variation of GHb assays in Victoria, Australia. **Diabetes Care** 1996;19:730-4.
 49. Little RR. Recent progress in glycohemoglobin (HbA_{1c}) (editorial). **Diabetes Care** 2000;23:265-6.
 50. Baynes JW, Bunn HF, Goldstein DE, et al. National Diabetes Data Group: report of the expert committee on glucosylated hemoglobin. **Diabetes Care** 1984;7:602-

- 6.
51. Little RR, Wiedmeyer H, England JD, et al. Interlaboratory comparison of glycohemoglobin results: College of American Pathologists Survey Data. **Clin Chem** 1991;37:1725-9.
52. Bodor GS, Little RR, Garret N, et al. Standardization of glycohemoglobin determinations in the clinical laboratory: three years of experience. **Clin Chem** 1992;38:2414-8.
53. Little RR, Wiedmeyer H, England JD, et al. Interlaboratory standardization of measurements of glycohemoglobins. **Clin Chem** 1992;38:2472-8.
54. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet FA, et al. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values determined by 111 laboratories using 21 methods. **Clin Chem** 1994;40:138-44.
55. Weykamp CW, Penders TJ, Miedema K, et al. Standardization of glycohemoglobin results and reference values in whole blood studied in 103 laboratories using 20 methods. **Clin Chem** 1995;41:82-6.
56. Gibb I, Parnham AJ, Lord C, et al. Standardization of glycosylated hemoglobin assays throughout the Northern region of England: a pilot study. **Diabet Med** 1997;14:584-8.
57. Gillery P, Dumont G, Vassault A. Evaluation of GHb assays in France by national quality control surveys. **Diabetes Care** 1998;21:265-70.
58. National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). University of Missouri, <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp>. Acesso em Julho 2003.
59. Miedema K. Electrospray mass spectrometry for measurement of glycohemoglobin. **Clin Chem** 1997;43:705-7.
60. Roberts NB, Green BN, Morris M. Potential of electrospray mass spectrophotometry for quantifying glycohemoglobin. **Clin Chem** 1997;43:771-8.
61. Kobold U, Jeppsson J-O, Dulffer T, et al. Candidate reference methods for hemoglobin A_{1c} based on peptide mapping. **Clin Chem** 1997;43:1944-51.
62. Grupo Interdisciplinar de Padronização da Hemoglobina Glicada - Posicionamento Oficial 2003. Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) e Sociedade Brasileira de Patologia Clínica (SBPC).
63. Felisberto M. Estratégias para padronizar resultados de glico-hemoglobina medidos por diferentes métodos nos laboratórios do Rio Grande do Sul. 20p. Monografia (Especialização), 2003. Faculdade de Farmácia/Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
64. Nathan D. Labile glycosylated hemoglobin contributes to hemoglobin A₁ as measured by liquid chromatography or electrophoresis. **Clin Chem** 1981;27:1261-3.
65. Little RR, England JD, Wiedmeyer H, Goldstein D. Effects of whole blood storage on results for glycosylated hemoglobin as measured by ion-exchange chromatography, affinity chromatography, and colorimetry. **Clin Chem** 1983;29:1113-5.
66. Simon M, Hoover JD. Effect of sample instability on glycohemoglobin (HbA₁) measured by cation exchange chromatography. **Clin Chem** 1982;28:195-8.
67. Camargo JL. Determinação da glico-hemoglobina: relação com a glicemia e aspectos analíticos. 129p. Tese (Doutorado), 2003. Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
68. Bry L, Chen PC, Sacks DB. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. **Clin Chem** 2001;47:153-63.
69. Weykamp CW, Penders TJ, Muskiet F, van der Silk W. Influence of hemoglobin variants and derivatives on glycohemoglobin determinations, as investigated by 102 laboratories using 16 methods. **Clin Chem** 1993;39:1717-23.
70. Roberts WL, McCraw M, Cook C. Effects of sickle cell trait and hemoglobin C trait on determinations of HbA_{1c} by an immunoassay method. **Diabetes Care** 1998;21:983-6.
71. Roberts WL, Chiasera JM, Ward-Cook KM. Glycohemoglobin results in samples with hemoglobin C or S trait: a comparison of four test systems. **Clin Chem** 1999;45:906-9.
72. Frank EL, Moulton L, Little RR, Wiedmeyer HM, Rohlfing C, Roberts WL. Effects of hemoglobin C and S traits on seven glycohemoglobin methods. **Clin Chem** 2000;46:864-7.
73. Roberts WL, Frank EL, Moulton L, Papadea C, Noffsinger JK, Ou CN. Effects of nine hemoglobin variants on five glycohemoglobin methods. **Clin Chem** 2000;46:569-72.
74. Nakanishi T, Miyazaki A, Iguchi K, Shimizu A. Effect of hemoglobin variants on routine glycohemoglobin measurements assessed by a mass spectrometric method. **Clin Chem** 2000;46:1689-92.
75. Gram-Hansen P, Eriksen J, Mourits-Andersen T, Olesen L. Glycosylated haemoglobin (HbA_{1c}) in iron- and vitamin B₁₂ deficiency. **J Intern Med** 1990;227:133-6.
76. Jiao Y, Okumiya T, Saimara T, Park K, Sasaki M. Abnormally decreased HbA_{1c} can be assessed with erythrocyte creatine in patients with a shortened erythrocyte age. **Diabetes Care** 1998;21:1732-5.
77. Tarim O, Kucukerdogan A, Gunay U, Eralp O, Ercan I. Effects of iron deficiency anemia on hemoglobin A_{1c} in type 1 diabetes mellitus. **Pediatr Int** 1999;41:357-62.
78. Camargo JL, Gross JL. Conditions associated with very low values of glycohemoglobin measured by a HPLC method. **J Clin Path** 2004;57:346-9.
79. Weykamp CW, Penders TJ, Siebelder CW, Muskiet FA, van der Slik W. Interference of carbamylated and acetylated hemoglobins in assays of glycohemoglobin by HPLC, electrophoresis, affinity chromatography, and enzyme immunoassay. **Clin Chem** 1993;39:138-42.
80. Weykamp CW, Miedema K, Haan T, Doelman CJ. Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. **Clin Chem** 1999;45:438-40.
81. Little R, Agrawal A, Tennill A, England J, Khanna R, Goel S, et al. Can glycohemoglobin (GHb) be used to accurately assess glycemic control in patients with chronic renal failure (CRF)? **Clin Chem** 1999;45(suppl):A4.
82. Nathan D, Francis TB, Palmer JL. Effect of aspirin on

- determinations of glycosylated hemoglobin. **Clin Chem** **1983**;29:466-9.
83. Koskinen LK, Korpela MM, Lahtela JT, Laippala PJ, Pikkarainen PH, Koivula TA. Effect of acetaldehyde and acetylsalicylic acid on HbA_{1c} chromatography in the FLPC method with Mono S cation exchanger. **Clin Chim Acta** **1998**;275:53-61.
84. Weykamp CW, Penders TJ, Baadenhuijsen H, Muskiet FA, Martina W, van der Slik W. Vitamin C and Glycohemoglobin. **Clin Chem** **1995**;41:713-6.
85. Davie S, Gould B, Yudkin JS. Effect of vitamin C on glycosylation of proteins. **Diabetes** **1992**;41:167-72.
86. Jain SK, Palmer M. The effect of oxygen radicals metabolites and vitamin E on glycosylation of proteins. **Free Radic Biol Med** **1997**;22:593-6.
87. Bloomgarden ZT. Antioxidants and diabetes. **Diabetes Care** **1997**;20:670-3.
88. Shoff SM, Mares-Perlman JA, Cruickshanks KJ, Klein R, Klein B, Ritter L. Glycosylated hemoglobin concentrations and vitamin E, vitamin C, and α -carotene intake in diabetic and non-diabetic older adults. **Am J Clin Nutr** **1993**;58:412-6.
89. Paolisso G, D'Amore A, Galzerano D, Balbi V, Giugliano D, Varricchio M, et al. Daily vitamin E supplements improve metabolic control but not insulin secretion in elderly type II diabetic patients. **Diabetes Care** **1993**;16:1433-7.
90. Fuller CJ, Chandalia M, Garg A, Grundy S, Jialal I. RRR- α -tocopheryl acetate supplementation at pharmacological doses decreases low-density-lipoprotein oxidative susceptibility but not protein glycation in patients with diabetes mellitus. **Am J Clin Nutr** **1996**;63:753-9.
91. Boeing H, Weisgerber UM, Jeckel A, Rose HJ, Kroke A. Association between glycosylated hemoglobin and diet and other lifestyle factors in a nondiabetic population: cross-sectional evaluation of data from the Potsdam cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition Study. **Am J Clin Nutr** **2000**;71:1115-22.
92. Krishnamurti U, Steffes MW. Glycohemoglobin: A primary predictor of the development or reversal of complications of diabetes mellitus. **Clin Chem** **2001**;47:1157-65.

Endereço para correspondência:

Jorge Luiz Gross
Serviço de Endocrinologia
Hospital de Clínicas de Porto Alegre
Rua Ramiro Barcellos 2350, Prédio 12, 4º andar
90035-003 Porto Alegre, RS
Fax: (51) 3332-5188
e-mail: jorgegross@terra.com.br