



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

RICTHELY VERÍSSIMO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA
FRAÇÃO HEMOGLOBINA A1C**

BRASÍLIA, 2020.

RICTHELY VERÍSSIMO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA
FRAÇÃO HEMOGLOBINA A1C**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Farmacêutico.
Faculdade de Ceilândia, Universidade de
Brasília.

Orientador: prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
Coorientador: Emerson Valadares da Silva

BRASÍLIA, 2020.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

VL732c Veríssimo de Lima, Ricthely
COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA
FRAÇÃO HEMOGLOBINA A1C / Ricthely Veríssimo de Lima;
orientador Eduardo Antonio Ferreira; co-orientador Emerson
Valadares da Silva. -- Brasília, 2020.
25 p.

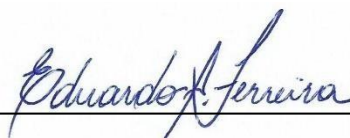
Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade de
Brasília, 2020.

1. Diabetes mellitus. 2. Hemoglobina glicada. 3.
Comparação entre métodos analíticos. I. Antonio Ferreira,
Eduardo, orient. II. Valadares da Silva, Emerson, co
orient. III. Título.

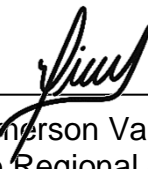
RICTHELY VERÍSSIMO DE LIMA

**COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DA
FRAÇÃO HEMOGLOBINA A1C**

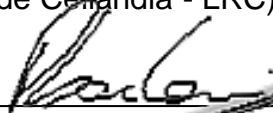
BANCA EXAMINADORA:



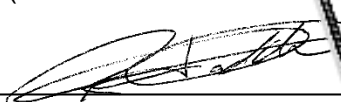
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Antonio Ferreira
(FCE/Universidade de Brasília)



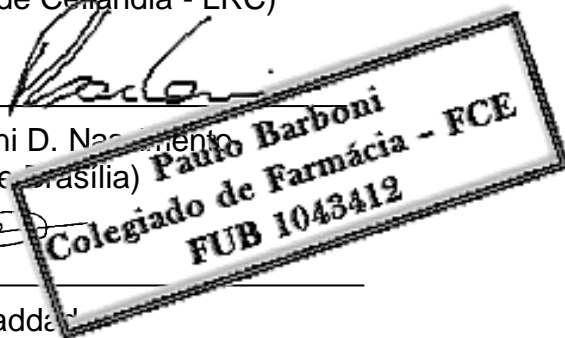
Coorientador: Emerson Valadares da Silva
(SESDF/Laboratório Regional de Ceilândia - LRC)



Prof.: Paulo Gustavo Barboni D. Nascimento
(FCE/Universidade de Brasília)



Prof.: Rodrigo Haddad
(FCE/Universidade de Brasília)



BRASÍLIA, 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à Nossa Senhora por estarem sempre comigo, me protegendo, me confortando e me guiando pelo caminho certo.

Agradeço aos meus pais por todo amor, em especial à minha mãe, por todo esforço e dedicação investidos na minha educação, por ser guerreira e um exemplo de pessoa e mulher.

Sou grata à minha família, minha avó Francinete, minha tia Francisca, meu avô Lourival e meus dois primos, em especial o Douglas, por todo apoio e amor que sempre me deram.

Também agradeço ao meu namorado Vinicius que, acima de tudo, é o meu melhor amigo, pela compreensão, paciência e por estar presente em todos os momentos difíceis, me incentivando e me mostrando o quanto sou capaz.

Agradeço às minhas amigas Ana Beatriz, que me incentivou e me ajudou a escolher o curso de Farmácia, e Fabiene, que foi um presente que a Universidade me deu e que levarei pro resto da vida.

Sou grata pelos meus colegas de curso Vitor, que me deu forças e me apoiou, e se tornou um irmão que ganhei através da UnB, e Juliana, por toda a ajuda mútua e carinho.

Gratidão ao meu orientador doutor Eduardo Antonio, por ter confiado a mim esse trabalho, que apesar de toda a rotina intensa da universidade, se dedicou e aceitou me orientar.

Sou grata, também, ao meu coorientador Emerson Valadares, pela confiança e pela grande atenção dispensada que se tornou essencial para que esse trabalho fosse concluído.

RESUMO

A hemoglobina glicada (HbA1c) é um marcador utilizado para o diagnóstico e acompanhamento do diabetes *mellitus* (DM). Esse diagnóstico é preciso e eficiente por medir a concentração da glicose presente na fração A1c da hemoglobina. O DM é uma das doenças crônicas mais acometidas no Brasil. Por isso, é importante o correto diagnóstico da diabetes e monitoramento dos pacientes. As metodologias que são utilizadas para a dosagem da HbA1c são padronizadas pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Para o processamento da HbA1c, existem, no mercado, vários tipos de metodologias. Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi comparar as duas metodologias para a dosagem da HbA1c, sendo um, cromatografia com afinidade ao boronato, e o outro, eletroforese por capilaridade, a fim de analisar os resultados obtidos e as diferenças entre as duas metodologias. As dosagens obtidas por cada equipamento foram correlacionadas e observou-se uma forte correlação linear entre os dois métodos, através dos coeficientes de correlação ($r = 0,9747$; $p = 0,0001$) e regressão ($\beta = 0,9912$; 95% de I.C. = 0,9813 a 1,001; $p = 0,0001$). Foi possível observar uma ligeira tendência de valores mais baixos pela capilaridade, e mais altos pela cromatografia com afinidade ao boronato, sendo necessários mais estudos para analisar as causas dessa diferença.

Palavras-chave: Diabetes *mellitus*, hemoglobina glicada, comparação entre métodos.

ABSTRACT

Glycated hemoglobin (HbA1c) is a marker used for the diagnosis and monitoring of diabetes mellitus (DM). This diagnosis is accurate and efficient because it measures the concentration of glucose present in the A1c fraction of hemoglobin. DM is one of the most affected chronic diseases in Brazil. Therefore, the correct diagnosis of diabetes and monitoring of patients is important. The methodologies that are used for the measurement of HbA1c are standardized by the National Program for Standardization of Glycohemoglobin (NGSP). For the processing of HbA1c, there are several types of methodologies on the market. In this context, the objective of the present study was to compare the two methodologies for the measurement of HbA1c, one being chromatography with affinity to boronate, and the other, capillarity electrophoresis, in order to analyze the results obtained and the differences between the two methodologies. . The dosages adjusted by each equipment were correlated and a strong linear correlation was observed between the two methods, through the correlation coefficients ($r = 0.9747$; $p = 0.0001$) and regression ($\beta = 0.9912$; 95% CI = 0.9813 to 1.001; $p = 0.0001$). It was possible to observe a slight trend of lower values due to capillarity, and higher ones due to chromatography with affinity to boronate, and further studies were considered to analyze the causes of this difference.

Keywords: Diabetes *mellitus*, glycated hemoglobin, comparison between methods.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADA – *American Diabetes Association*

DM – *Diabetes mellitus*

EDTA – *Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético*

Hb – *Hemoglobina*

HbA1c – *Hemoglobina glicada*

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

I.C. = *Intervalo de Confiança*

NGSP – *National Glycohemoglobin Standardization Program*

p – *Significância*

r – *Coefficiente de correlação de spearman*

SBD – *Sociedade Brasileira do Diabetes*

TOTG – *Teste Oral de Tolerância à Glicose*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Hemoglobinas formadas durante o desenvolvimento ontogenético humano.	10
Quadro 2- Os dois diferentes métodos utilizados para comparação.	15

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Gráfico da amostra 16 plotado pelo software do equipamento Premier Hb9210™	16
Figura 2- Gráfico da amostra 16 plotado pelo software do equipamento Capillarys 2 Flex Piercing®.....	18
Figura 3- Regressão linear para a análise dos resultados das duas metodologias.....	19
Figura 4- Comparação do número total de amostras das duas metodologias classificadas conforme descrito pelo NGSP.....	20
Figura 5- Valores de cada amostra comparadas entre si mesmas conforme cada metodologia utilizada.....	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	Hemoglobina glicada.....	10
1.2	Diabetes <i>mellitus</i>	12
1.3	Diagnóstico	12
1.4	Outros tipos de Hemoglobinas.....	13
2	JUSTIFICATIVA.....	14
3	OBJETIVOS	14
3.1	Objetivos gerais	14
3.2	Objetivos específicos	14
4	METODOLOGIA.....	15
4.1	Equipamento Premier Hb9210™	16
4.2	Equipamento Sebia Capillarys 2 Flex Piercing®.....	17
5	RESULTADOS.....	19
6	DISCUSSÃO	21
7	CONCLUSÃO	23
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	24

1 INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobina glicada

A hemácia é produzida na medula óssea por um processo chamado hematopoese, o qual se insere a eritropoese, dando origem às células vermelhas. A hemoglobina é a proteína que está presente nas hemácias a fim do transporte do oxigênio e tem a vida média de 120 dias. Essa é formada pelas subunidades heme e globina, sendo sintetizadas, na mitocôndria e no ribossomo do eritrócito, respectivamente (LOPES ET AL., 2011).

A síntese das globinas é controlada por genes, nos cromossomos 11 e 16, formando, assim, as cadeias α , β , γ e δ . A partir de então, são formadas as hemoglobinas Gower-1, Gower-2 e Portland na fase embrionária, a F na fase fetal, e as hemoglobinas A, A₂, que são sintetizadas em maior quantidade na fase adulta, como estão descritas no quadro 1. (ZAGO et al. 2013).

Quadro 1. Hemoglobinas formadas durante o desenvolvimento ontogenético humano.

Período	Hemoglobina	Globinas
Embrionário	Hb Gower-1	$\xi_2\varepsilon_2$
	Hb Gower-2	$\alpha_2\varepsilon_2$
	Hb Portland	$\xi_2\gamma_2$
Fetal	Hb F	$\alpha_2\gamma_2$
Adulto	Hb A	$\alpha_2\beta_2$
	Hb A ₂	$\alpha_2\delta_2$

Fonte: Zago et al. 2013, p. 193. Adaptado.

O padrão da hemoglobina presente no adulto é de, aproximadamente, 97% da Hb A, 2% da Hb A₂ e 1% da Hb Fetal, esta, presente em maior concentração no período fetal. (ALMEIDA et al., 2011).

De acordo com Tavares et al. (2019), a hemoglobina do tipo A (HbA) é a principal forma de hemoglobina no pós nascimento, sendo a hemoglobina glicada um conjunto de substâncias que são formadas entre a HbA e alguns açúcares, sendo dividida em HbA₁ e HbA₀. A HbA₀ não carrega a glicose consigo, já a HbA₁ é descrita como carreadora da glicose e carboidratos. A HbA_{1c} é a fração onde é dosada a glicohemoglobina.

A hemoglobina glicada (HbA_{1c}) é um dos principais critérios para o diagnóstico e acompanhamento da hiperglicemia. É um método importante, pois mede a

concentração da glicose no sangue de, em média, 60 a 120 dias. (TAVARES et al., 2019).

Há alguns anos, como relata o estudo de Gross et al. (2002), o diagnóstico se fundamentava apenas nos critérios de glicose plasmática de jejum ou após a ingestão de uma sobrecarga de glicose (TOTG). Os valores normais de glicose plasmática eram de < 110 mg/dL e TOTG de < 140 mg/dL. Considerava-se, assim, diagnóstico de DM quando a glicose plasmática era ≥ 126 mg/dL e TOTG ≥ 200 mg/dL. Esse mesmo estudo afirma que “a medida de glico-hemoglobina não apresenta acurácia diagnóstica adequada e não deve ser utilizada para o diagnóstico de diabetes.”

A HbA1c era apenas utilizada como controle glicêmico a longo prazo, sendo apenas uma medida de acompanhamento de pacientes diagnosticados, antes, pela glicemia plasmática em jejum, TOTG e/ou glicemia. O preconizado era que a medida da A1c fosse realizada, em média, a cada 3 a 4 meses. (GROSS et al., 2002).

A hemoglobina glicada passou a ser um critério para o diagnóstico da DM em 2010, pela validação após estudos feitos pela *American Diabetes Association* (ADA) da importância e da relação da HbA1c com a glicose no organismo, ressaltando a sua importância em conjunto com os demais processos, com a finalidade de assegurar um correto diagnóstico, como disposto pelos autores Tavares et al. (2019).

Atualmente, os valores de referência dos critérios diagnósticos e de acompanhamento do DM foram atualizados conforme já citado anteriormente. A SBD relaciona os valores de > 110 mg/dL da glicemia em jejum, que antes eram normais, nos dias de hoje é considerado como pré-diabetes (de 100 a 125 mg/dL), enquanto a HbA1c, antes com níveis entre 4 e 6% estando normais, como critério, também considera-se pré-diabetes (SBD, 2019).

Na formação da hemoglobina glicada, a porção final do aminoácido valina (NH₂) se liga irreversivelmente, por uma reação não enzimática, à cadeia β da hemoglobina, definida como glicação. Como a membrana da hemácia é permeável à glicose, a concentração é proporcional à concentração plasmática pela exposição da hemoglobina através da glicação (TAVARES et al., 2019).

Segundo Azevedo et al. (2011), existem situações fisiológicas ou patológicas que interferem com a HbA1c, como, por exemplo, anemias, hemoglobinopatias, deficiência na eritropoietina, distúrbio na medula óssea, doenças hepáticas, esplenomegalias, artrite reumatoide, alcoolismo, insuficiência renal crônica, aumento no número de eritrócitos, entre outros.

1.2 Diabetes *mellitus*

Diabetes *mellitus* (DM) é uma desordem metabólica caracterizada pela hiperglicemia (aumento dos níveis de glicose no sangue), resultante da não produção ou produção insuficiente da insulina, ou a produção adequada, mas com uma deficiência na ação da insulina nas células do corpo. A insulina é um hormônio sintetizado pelas células beta do pâncreas e serve para transportar a glicose do sangue para dentro das células (ASMAT, ABAD E ISMAIL, 2015).

A DM é classificada em tipo I, tipo II, diabetes gestacional, entre outras. A DM tipo I é definida como a não produção ou produção insuficiente de insulina pelas células beta. A DM tipo II é ocasionada por uma produção de insulina, porém há resistência pelas células do corpo, tornando o transporte da glicose insuficiente e ineficaz. Essa condição se dá por fatores genéticos e/ou ambientais, como por exemplo, a diabetes proveniente da obesidade (BERTONHI, 2017).

A DM, além da sintomatologia, pode trazer diversas complicações. Problemas graves de saúde como nefropatia diabética, doenças coronárias, neuropatia e retinopatia, que pode levar à cegueira, são acometidas em longo prazo (ROMANCIUC, 2017).

1.3 Diagnóstico

Os testes de glicemia em jejum são feitos com ausência de ingestão calórica por pelo menos 8 horas. A glicemia com carga de 75 g de glicose dissolvida em água é um teste feito em pacientes com glicemia de jejum entre 100 mg/dL e 125 mg/dL. A confirmação de DM se dará pela positividade de qualquer um dos testes descritos (SBD, 2019).

De acordo com a Sociedade Brasileira de Diabetes (2019, p.12), o diagnóstico do DM é feito pelos seguintes critérios: hemoglobina A1C $\geq 6,5\%$; ou glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL; ou glicemia duas horas após a sobrecarga com 75 g de glicose – Teste Oral de Tolerância à Glicose (TOTG): ≥ 200 mg/dL; ou glicemia ao acaso, sendo ≥ 200 mg/dL.

A Sociedade Brasileira de Diabetes (2019, p.12) descreve que o diagnóstico do pré-diabetes e o risco aumentado de DM, os critérios são: glicemia de jejum entre 100 e 125 mg/dL; ou TOTG entre 140 mg/dL e 199 mg/dL; ou A1C entre 5,7% a 6,4%. Se a concentração estiver acima do limite superior de qualquer um dos parâmetros descritos, é diagnosticado, então, o quadro de pré-diabetes.

1.4 Outros tipos de Hemoglobinas

Variações genéticas podem produzir diferentes tipos de hemoglobinas, seja por defeitos estruturais nas cadeias das globinas, ou por defeitos no ritmo de síntese das globinas (talassemias), ou até pela persistência genética de hemoglobina fetal (ZAGO et al. 2013). O estudo realizado por Alves et al. (2013) afirma que pessoas que possuem hemoglobinas variantes afetam de diferentes formas cada metodologia utilizada para a determinação da HbA1c. No método cromatográfico com afinidade ao boronato, o ácido bórico afeta determinados grupos que são produtos da glicação. Desse modo, hemoglobinas variantes que possui uma elevada glicação, pode apresentar interferência nessa metodologia.

A HbA1c pode ser influenciada pelas hemoglobinas variantes, podendo, assim, interferir no resultado, estando associadas com a diminuição da vida média das hemoglobinas. Assim como apontam Alves et al. (2013), a concentração da hemoglobina glicada é dosada em porcentagem, portanto, qualquer mutação ou variante poderia interferir na ligação da porção N-terminal da hemoglobina com a glicose, dando um valor falso positivo ou negativo, a depender da variação.

A presença da hemoglobina variante S é apontada como um dos fatores que possam causar alterações durante a análise da HbA1c por apresentar uma vida curta da hemácia e a sua dificuldade em se ligar a glicose devida a sua mutação genética, como relata os autores Netto et al. (2009), a dosagem da hemoglobina glicada pode ser interferida por todas as variantes da hemoglobina, como a Hb S, Hb C, Hb Fetal, Hb E, Hb D, entre outras. Porém, não é possível dosar a HbA1c nas hemoglobinopatias (variantes) homozigóticas, pela ausência da Hb A.

2 JUSTIFICATIVA

Devido à alta prevalência da DM, o diagnóstico e acompanhamento têm grande relevância na qualidade de vida dos pacientes acometidos com essa doença. A hemoglobina glicada tem vantagens como a facilidade no exame, já que o paciente não precisa estar em jejum, pois a glicose se relaciona à meia-vida da hemoglobina. Diferentes metodologias automatizadas podem ser empregadas para a dosagem da HbA1c, desde que sejam padronizadas pela *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Por isso, a comparação de duas diferentes metodologias automatizadas assegura a confiabilidade dos resultados das amostras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Estabelecer uma comparação entre dois métodos analíticos padronizados para a dosagem da fração hemoglobina A1c, utilizadas como um marcador do diagnóstico e monitoramento da diabetes *mellitus*.

3.2 Objetivos específicos

- Determinação da HbA1c em sangue total pelo método de eletroforese por capilar.
- Determinação da HbA1c em sangue total pelo método cromatográfico por afinidade ou afinidade por boronato.
- Comparação dos resultados entre as duas metodologias utilizadas na dosagem de HbA1c.
- Correlação estatística dos dados obtidos para observar se há associação e significância entre os diferentes métodos.

4 METODOLOGIA

As duas metodologias comparadas são certificadas pela NGSP, no qual visa a padronização dos resultados e interpretação na dosagem da HbA1c. Segundo as Diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes (2019), a NGSP certifica que todos os resultados obtidos através das metodologias padronizadas têm resultado clínico satisfatório, podendo ser utilizados nas rotinas laboratoriais e prática clínica. Cada equipamento padronizado pela NGSP consta num quadro disponibilizado no site e pelas Diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes, informando a marca, a metodologia empregada e as possíveis interferências relacionado com o tipo de hemoglobina, como apresentado a seguir no quadro 1.

Quadro 1. Os dois diferentes métodos utilizados para comparação, segundo a NGSP.

Nome do ensaio	Método	Interferências				
		HbC	HbS	HbE	HbD	HbF
Sebia Capillarys 2 Flex Piercing®	Eletroforese por capilar	∅	∅	∅	∅	∅ (se proporção de HbF < 15%)
Trinity (Primus) HPLC (Affinity)	Afinidade ao boronato	∅	∅	∅	∅	∅ (se proporção de HbF < 15%)

Fonte: Dados extraídos da *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP). Adaptado.

Para o processamento, as amostras de sangue venoso foram colhidas em tubo contendo anticoagulante EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético), de pacientes portadores ou não de diabetes. A dosagem da HbA1c foi feita em dois equipamentos diferentes, automatizados: no Premier Hb9210™, marca TRINITY BIOTECH e no Capillarys 2 Flex Piercing®, marca SEBIA®.

Foram processadas 464 amostras que foram analisadas primeiramente no Premier Hb9210™, pois é necessário que, através do repouso da amostra, o plasma se separe do concentrado de hemácias. Logo em seguida, as mesmas amostras foram homogeneizadas manualmente e processadas pelo Capillarys 2 Flex Piercing®. Os dois equipamentos possuem metodologias distintas e que foram utilizadas para comparação dos resultados.

Para a análise dos dados, foi utilizado o software GraphPad Prism na versão 8.0.1. Através dessa ferramenta, foi avaliada a presença de associação linear entre os dois métodos através da correlação não paramétrica de Spearman (r) e dos coeficientes de regressão linear (β), sendo considerada a variável dependente o HPLC com afinidade ao boronato (Premier Hb9210™), e a variável independente a eletroforese por capilaridade (Capillarys 2 Flex Piercing®). Foi considerado um nível de significância de $p < 0,05\%$ e confiabilidade de 95%.

4.1 Equipamento Premier Hb9210™

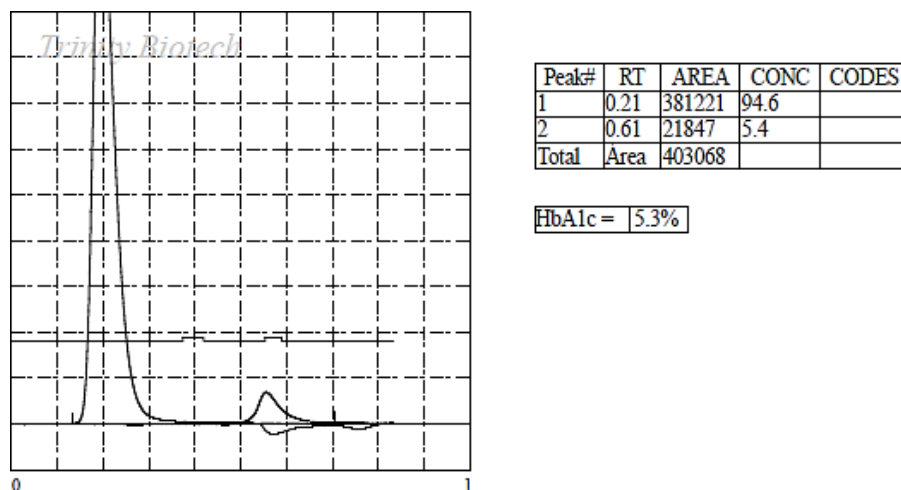
O Premier Hb9210™ utiliza princípios de afinidade com o boronato e de cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Possui uma coluna de ácido fenilborônico, equilibrado ao pH e força iônica (MANUAL PREMIER Hb9210™, p. 7, 2012). Nessa metodologia, o ácido fenilborônico se liga à superfície do suporte da coluna, retendo as moléculas glicosadas reconhecidas pelos seus grupamentos cis diol, formando um complexo diol + ácido borônico. Logo após, elui da coluna o componente glicosilado com o reagente utilizado para a extrair a molécula glicosada do boronato (MANUAL PREMIER Hb9210™, p.36, 2012).

De acordo com o Manual Premier Hb9210™ (2012, p.36).

As amostras hemolisadas para a análise de HbA1c são injetadas automaticamente na coluna durante o fluxo do Reagente Tampão A do Premier Hb9210™. O componente glicosilado liga-se ao boronato enquanto o componente não glicosilado passa pela coluna até o detector espectrofotométrico, onde é detectado a 413 ± 2 nm. Após a eluição do componente não glicosilado, o sistema bombeia o Reagente Tampão B Premier Hb9210™, que extrai o componente glicosilado da coluna. O componente glicosilado passa então através do detector.

Após analisadas as amostras no equipamento, o resultado é dado pelo equipamento através da porcentagem (%) da fração A1c, conforme padronizado pelo NGSP. Cada amostra é apresentada, pelo equipamento, em um gráfico que separa a fração A1c do restante da hemoglobina, conforme a figura 1, sendo o primeiro pico a hemoglobina total, e o segundo, a HbA1c.

Figura 1. Gráfico da amostra 16 plotado pelo software do equipamento Premier Hb9210™.



Fonte: Extraído do software da Premier Hb9210™.

4.2 Equipamento Sebia Capillarys 2 Flex Piercing®

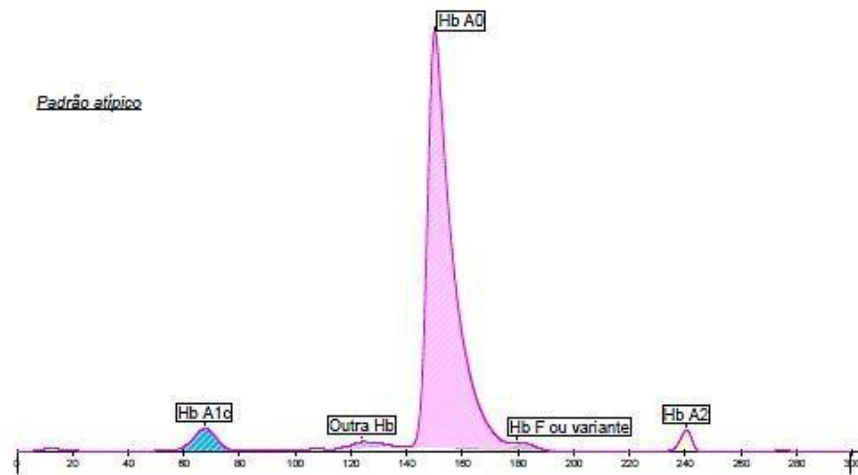
O Capillarys 2 Flex Piercing® utiliza o princípio de eletroforese capilar em solução livre. Assim, as moléculas carregadas, através da mobilidade eletroforética, são separadas em um regulador de alcalinidade com um pH específico. A eletroforese é feita através de capilares de sílica. (CAPILLARYS HbA1c, p. 96, 2017).

Nessa metodologia, as amostras são injetadas automaticamente e, de acordo com o manual Capillarys HbA1c (2017, p. 96).

As moléculas carregadas eletricamente são separadas em função da sua mobilidade eletroforética num regulador de alcalinidade (*buffer*) com um pH específico. O equipamento possui capilares de sílica que funcionam em paralelo fazendo 8 análises simultâneas de quantificação da HbA1c. A preparação de diluição da amostra é feita com solução hemolisante, que depois é injetada por aspiração na extremidade anódica do capilar. Em seguida, as proteínas são separadas através de alta-voltagem e a detecção direta das hemoglobinas é efetuada a 415 nm (nanômetros) na extremidade catódica do capilar, determinando, então, a fração da hemoglobina glicada. Através da utilização de um regulador de pH alcalino, as hemoglobinas normais e anormais (ou variantes) são detectadas na seguinte ordem, no sentido do cátodo para o ânodo: A2/C, E, S/D, F, A0, outra Hb (incluindo Hb A1 menor) e depois a A1c.

Após analisadas as amostras no equipamento, o resultado é obtido pelo equipamento através da porcentagem (%) da fração A1c, conforme padronizado pelo NGSP, e também em massa molar (mMol) de HbA1c por mol de hemoglobina. Cada amostra é apresentada, pelo equipamento, em um gráfico que separa a fração A1c e as demais frações da hemoglobina, separadamente, conforme a figura 2.

Figura 2. Gráfico da amostra 16 plotado pelo software do equipamento Capillarys 2 Flex Piercing®.



A1c Haemoglobin Electrophoresis

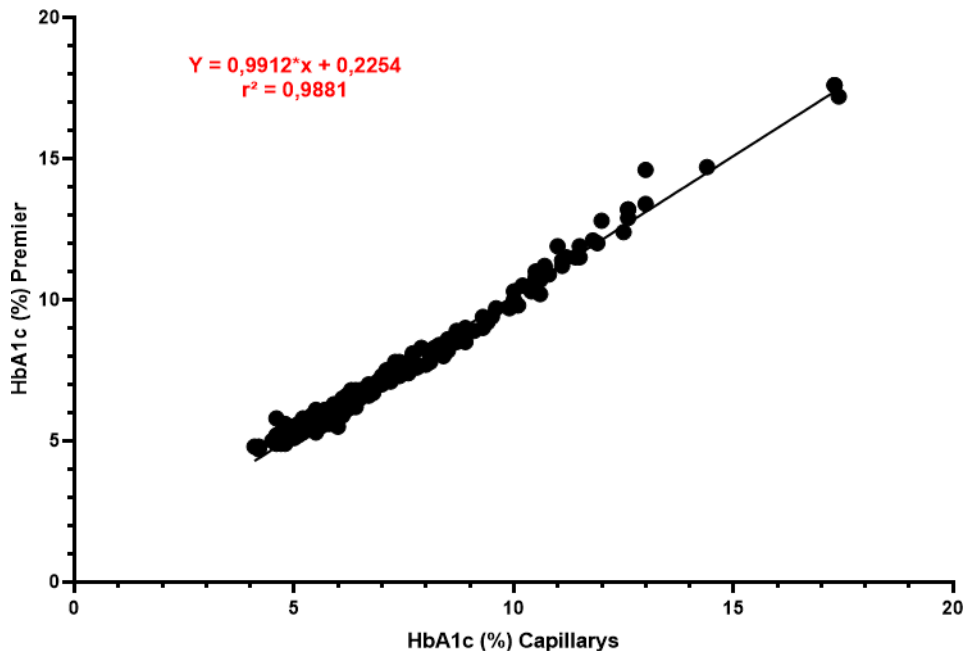
Fractions	%	mmol/mol	Cal. %
Hb A1c (*)	-	33	5,1
Outra Hb	1,8		
Hb A0	90,3		
Hb F ou variante	1,1		
Hb A2	2,2		

Fonte: Extraído do software do Capillarys 2 Flex Piercing®.

5 RESULTADOS

Nas 464 amostras estudadas, o valor médio de HbA1c no Premier Hb9210™ foi de $6,7 \pm 2,0432$, enquanto o valor médio no Capillarys 2 Flex Piercing® foi de $6,6 \pm 2,0409$. A correlação dos valores pareados entre as duas metodologias apresentou uma forte associação linear através do coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,9747$; $p = 0,0001$) e regressão ($\beta = 0,9912$; 95% de I.C. = 0,9813 a 1,001; $p = 0,0001$). A intercepção de 0,2254 (95% de I.C. = 0,1570 a 0,2938) demonstrou concordância entre os resultados. O gráfico da regressão linear está disposto na figura 3.

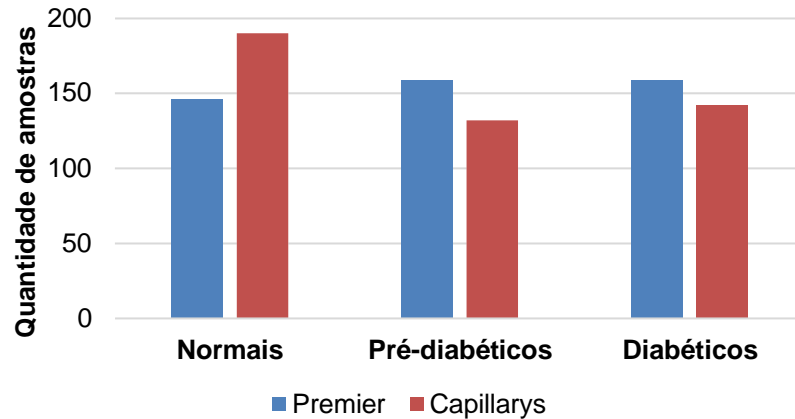
Figura 3. Regressão linear para a análise dos resultados das duas metodologias.



Fonte: Autoria própria (2020). r^2 - coeficiente de correlação; a equação é apresentada como $Y = \beta x + \alpha$, sendo β a inclinação da reta de regressão e α a intercepção.

Os resultados dos dois equipamentos foram plotados num gráfico de coluna para a comparação do número de amostras foram classificados por grupos, conforme padronizado pelo NGSP, em normais ($<5,6\%$), pré-diabéticos ($>5,7\%$ a $6,4\%$) ou diabéticos ($>6,5\%$), como apresentado na figura 4.

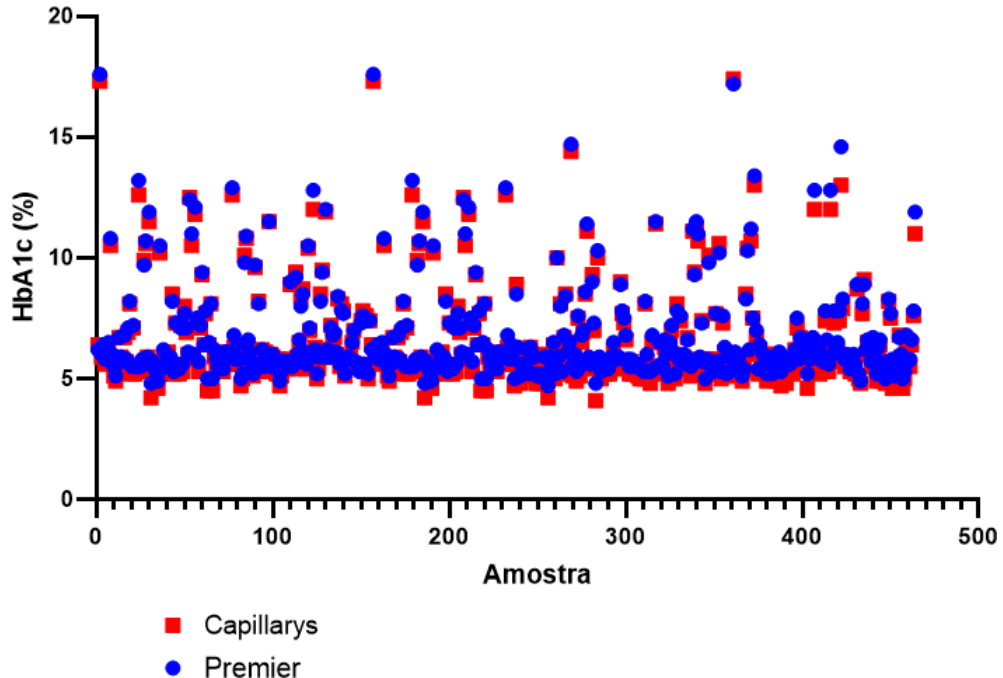
Figura 4. Comparação do número total de amostras das duas metodologias classificadas conforme descrito pelo NGSP.



Fonte: Autoria própria (2020).

Como mostrado na figura 5, a fim de comparar os resultados obtidos em porcentagem de todas as amostras, foi utilizado um gráfico relacionando a mesma amostra com as duas metodologias, separadamente.

Figura 5. Valores de cada amostra comparadas entre si mesmas conforme cada metodologia utilizada.



Fonte: Autoria própria (2020).

6 DISCUSSÃO

A análise dos dados obtidos indica uma forte associação linear, apresentando concordância e correlação entre os valores. Ao comparar os resultados, é possível observar que as dosagens obtidas através de HPLC com afinidade ao boronato demonstrou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em relação à eletroforese por capilaridade.

Um estudo feito por Genc et al. (2014) compara quatro diferentes métodos de dosagem de HbA1c. Em uma das comparações, eles analisam o método de HPLC com afinidade ao boronato utilizando o equipamento Premier Hb9210™ e o método eletroforese por capilaridade com o equipamento da Capillarys 2 Flex Piercing®. Em 224 amostras de sangue colhidas em tubos contendo EDTA, ao compararem as duas metodologias citadas, eles obtiveram como resultado uma boa correlação entre os métodos através do coeficiente de correlação de Spearman ($r = 0,98$ e $p = 0,001$), e uma boa concordância entre os valores através da regressão linear ($\beta = 1,0$; 95% de I.C. = 0,0000 a 0,2981). A intercepção foi de 1,1185 e a equação $y = 1.0x+1$, $r^2 = 0,9974$.

Uma comparação de metodologias feita por Alvarez (2018) entre os equipamentos Premier Hb9210™ e Capillarys 2 Flex Piercing®, teve por objetivo avaliar a correlação entre os resultados dos dois métodos, utilizando 150 amostras aleatórias. A correlação entre as metodologias foi de 97% ($p < 0,05$), evidenciando alta correlação. A regressão linear apresentou a equação $y = 1.033x + 0.159$. A conclusão da análise feita por Alvarez foi que houve uma ligeira tendência de valores mais altos para o Premier Hb9210™ em relação ao Capillarys 2 Flex Piercing®, recomendando novos estudos com um maior número de amostras e metodologias para garantir a confiabilidade (ALVAREZ, 2018).

Assim, é possível perceber que os resultados obtidos no presente trabalho estão próximos dos resultados mostrados nos estudos apresentados de Genc et al. (2014) e Alvarez (2018). As duas análises apresentaram uma boa correlação entre os dois métodos, $r = 0,98$ e $r = 0,97$. Demonstraram, também, que há concordância entre os resultados obtidos através da regressão linear, $\beta = 1,0$ e $\beta = 1,033$. Alvarez (2018) também constatou, assim como observado nesse trabalho, que há uma tendência de os valores serem maiores no Premier Hb9210™ e menores do Capillarys 2 Flex Piercing®.

Pode-se afirmar que há uma limitação em relação à literatura disponível sobre a comparação metodológica entre o HPLC com afinidade ao boronato e eletroforese por capilaridade, sendo possível observar maiores números de trabalhos comparando outras metodologias, como HPLC por troca iônica, imunoenensaio e capilaridade isoelétrica (KOVAL et al., 2011; ROLLBORN et al., 2017; KHASHOGGI et al., 2018; SRIWIMOL et al., 2020).

Portanto, esse trabalho é relevante devido aos poucos estudos existentes sobre a análise metodológica realizada, sendo necessários estudos mais aprofundados para analisar quais fatores fazem com que as dosagens feitas pela eletroforese por capilaridade tendem a ser menores do que pelo HPLC com afinidade ao boronato.

7 CONCLUSÃO

Visando a importância do diagnóstico da diabetes nos dias atuais e a variedade de metodologias padronizadas para a dosagem da HbA1c, é relevante a associação entre os métodos utilizados para esse fim.

Os resultados obtidos demonstraram compatibilidade quando comparadas aos resultados presentes nas literaturas. Comprovaram, do mesmo modo, que há associação e significância estatística, assim como as demais literaturas citadas. Igualmente, foi possível observar uma ligeira tendência de resultados mais altos pelo HPLC com afinidade ao boronato, e mais baixos para a eletroforese por capilaridade, como disposto, também, em outra literatura.

Uma possível hipótese para a prevalência de valores menores pela eletroforese por capilaridade, pode ser devido a separação que o método faz dos diferentes tipos de hemoglobina, enquanto o HPLC com afinidade ao boronato não diferencia, separando apenas a parte glicada das demais, como já visto.

Por isso, se fazem necessários mais estudos para analisar e comprovar as possíveis causas dessa diferença, e, dessa maneira, avaliar as diferentes interferências que as demais hemoglobinas podem causar. Sendo assim, essa análise metodológica é relevante para avaliar se as diferenças entre os métodos podem ou não interferir na conduta clínica do paciente, principalmente, na presença de hemoglobinas variantes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, Lais Pinto de et al. O laboratório clínico na investigação dos distúrbios da hemoglobina. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 3, p. 271-278, 2011.

ALVAREZ, Cristian Flores. **Evaluación comparativa entre resultados de hemoglobina glicosilada obtenidos de dos metodologías automatizadas en el Hospital Nacional Arzobispo Loayza en el año 2016**. 2018.

ALVES, M. et al. Diabetes Mellitus e A1c: Importância das Variantes da Hemoglobina. A propósito de um caso clínico. **Revista Portuguesa de Diabetes**, v. 8, n. 1, p. 42-6, 2013.

ASMAT, Ullah; ABAD, Khan; ISMAIL, Khan. Diabetes mellitus and oxidative stress—A concise review. **Saudi pharmaceutical journal**, v. 24, n. 5, p. 547-553, 2016.

AZEVEDO, Teresa et al. Comparação dos resultados do doseamento de hemoglobina A1c obtidos por sistemas portáteis com o método de referência Comparison of results of hemoglobin A1c obtained by portable systems with the reference method. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, v. 1, n. 15, p. 22, 2011.

BERTONHI, Laura Gonçalves. Diabetes mellitus tipo 2: aspectos clínicos, tratamento e conduta dietoterápica. **Revista Ciências Nutricionais Online**, v.2, n.2, p.1-10, 2018.

FACTORS THAT INTERFERE WITH HBA1C TEST RESULTS. **NGSP**, 2019.
Disponível em: <http://www.ngsp.org/factors.asp>. Acesso em: 11 de nov. de 2020.

GENC, S. et al. The analytical performances of four different glycated hemoglobin methods. **Med chem**, v. 4, n. 501, p. 5, 2014.

GraphPad: Prism. Versão 8.0.1: GraphPad Software Inc. Disponível em: <https://www.graphpad.com/>

GROSS, Jorge L. et al. Diabetes melito: diagnóstico, classificação e avaliação do controle glicêmico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

KHASHOGGI, Haneen et al. New HPLC instrument performance evaluation in HbA1c determination and comparison with capillary electrophoresis. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 78, n. 5, p. 393-397, 2018.

KOVAL, Dušan; KAŠIČKA, Václav; COTTET, Hervé. Analysis of glycated hemoglobin A1c by capillary electrophoresis and capillary isoelectric focusing. **Analytical biochemistry**, v. 413, n. 1, p. 8-15, 2011.

LOPES, Flavio Marques et al. Avaliação da hemoglobina glicada como importante marcador do Diabetes Mellitus. **Ensaios e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 15, n. 3, p. 65-82, 2011.

MARQUES, Isabella de Cássia. **Diabetes mellitus: principais aspectos e diagnóstico através da dosagem de hemoglobina glicada**. 2018. 55 p. (Farmácia) - Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2018.

NETTO, Augusto Pimazoni et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, n. 1, p. 31-48, 2009.

ROLLBORN, Niclas et al. Analysis of HbA1c on an automated multicapillary zone electrophoresis system. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation**, v. 77, n. 1, p. 15-18, 2017.

ROMANCIUC, Maria. **Diabetes Mellitus Tipo 2 como Doença Inflamatória: anatomia, fisiopatologia e terapêutica**. 2017. 63 p. (Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Algarve, 2017.

SEBIA® (França). **Capillarys Hb A1c**: Ref. 2015. 2017. 23 p. v.12.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**. 2019. Disponível em: <https://www.diabetes.org.br/profissionais/images/DIRETRIZES-COMPLETA-2019-2020.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2020.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. **Posicionamento Oficial SBD 01/2019: terapêutica no diabetes tipo 2: algoritmo SBD**. São Paulo, p. 1-40, dez./2005. Disponível em: https://www.diabetes.org.br/publico/images/pdf/sbd_dm2_2019_2.pdf. Acesso em: 30 set. 2019.

SRIWIMOL, Wilaiwan et al. Strong correlation and high comparability of capillary electrophoresis and three different methods for HbA1c measurement in a population without hemoglobinopathy. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 80, n. 2, p. 139-150, 2020.

TAVARES, I., RIBEIRO, R. M., FERREIRA, L. P., & DE BIASI MELLO, O. J. A importância da hemoglobina glicada no controle diabético e seu comparativo com a glicemia de jejum em pacientes de Itanhandu, MG. **Revista Saúde em Foco**, n. 11, p. 226-238, 2019.

TRINITY BIOTECH. **Manual do operador: Premier Hb9210™ com Software AFFINITY™**. 11. ed. rev. 2012. 100 p.

ZAGO, Marco Antônio; FALCÃO, Roberto Passeto; PASQUINI, Ricardo. Tratado de hematologia. **São Paulo: Editora Atheneu**, 2013.