

Diabetes Mellitus e A1c: A Importância das Variantes da Hemoglobina. A Propósito de um Caso Clínico

Diabetes Mellitus and A1c: The Importance of Hemoglobin Variants. A Case Report

M. Alves, M. Bastos, M. Carvalheiro, F. Carrilho

Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, HUC - CHUC, EPE, Portugal

Serviço de Hematologia, Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, CHC - CHUC, EPE, Portugal

Resumo

Introdução: A hemoglobina glicada A1c (A1C) é usada para diagnóstico e monitorização do controlo glicémico em pessoas com diabetes. A precisão dos métodos de doseamento da A1C é afectada pela presença de variantes de hemoglobina.

Caso Clínico: Apresenta-se o caso de uma mulher seguida em consulta por obesidade e hipotireoidismo primário tratado, com antecedentes familiares de risco cardiovascular elevado. Referia aumento recente de peso. Apresentava IMC=32,5 Kg/m², TA 140/90 mmHg. O estudo laboratorial revelou glicemia em jejum de 108 mg/dL. Em reavaliação analítica apresentava glicemia de 106 mg/dL e A1C de 14% (VR:4-6). Perante esta discrepância, avaliou-se a possibilidade de erro laboratorial (repetição de A1C: 18,5%). O hemograma e o metabolismo do ferro não mostraram alterações. Por suspeita de interferência no doseamento, estudaram-se as hemoglobinas, tendo-se identificado uma variante. A sequenciação do gene HBA1 revelou heterozigotia para a mutação $\alpha 1$ CD40 AAG-AAC (Lis-Asn) – variante Hb Saratoga Springs. Pelo risco de transmissão familiar, rastream-se os familiares.

Conclusões: A avaliação da discordância entre A1C e glicemia plasmática permitiu identificar uma variante rara de hemoglobina, responsável por valores falsamente elevados de A1C. Apesar das vantagens da A1C no diagnóstico e monitorização da diabetes, devem ser conhecidas as limitações dos diferentes métodos.

Abstract

Introduction: Glycated hemoglobin A1c (A1C) is used for diagnosis and monitoring of glycemic control in people with diabetes. The precision of A1C assay methods is affected by the presence of hemoglobin variants.

Clinical Case: We present the case of a woman in consultation for obesity and treated primary hypothyroidism, with a family history of elevated cardiovascular risk. She reported recent weight gain. BMI=32.5 kg/m², BP 140/90 mmHg. Laboratory tests revealed fasting plasma glucose of 108 mg/dL. At analytical reassessment she showed fasting blood glucose of 106 mg/dL and A1C of 14% (RR:4-6). Given this discrepancy, we evaluated the possibility of laboratory error (repeated A1C of 18.5%). Blood count and iron metabolism showed no abnormalities. Suspecting of assay interference, we studied the hemoglobins, and have identified a variant. The genetic sequencing revealed heterozygosity for the HBA1 mutation $\alpha 1$ CD40-AAC AAG (Lys-Asn) - Saratoga Springs Hb variant. We tracked up the family for the risk of familial transmission.

Conclusions: The evaluation of discrepancy between A1C and plasma glucose identified a rare hemoglobin variant, responsible for falsely elevated A1C. Despite the advantages of A1C in the diagnosis and monitoring of diabetes, the different methods limitations must be known.

> INTRODUÇÃO

A hemoglobina glicada A1c (A1C) resulta da ligação covalente de moléculas de glicose a um resíduo de valina

CORRESPONDÊNCIA

Márcia Inês Paiva Alves
Serviço de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo
Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, HUC – CHUC, EPE
Praceta Prof. Mota Pinto
3000-075 Coimbra - Portugal
Tel: +351 239 400 400
E-mail: endocdiab@huc.min-saude.pt, marcia.ines.alves@gmail.com

na extremidade N-terminal da cadeia β da hemoglobina, formando glicohemoglobinas. Assim, a A1C reflecte a glicémia média durante o tempo de vida eritrocitário, correlacionando-se directamente com o risco cardiovascular. Actualmente, esta é usada para diagnóstico e monitorização do controlo glicémico em pessoas com diabetes. A precisão dos métodos de doseamento da A1C é afectada pela presença de variantes de hemoglobina.

> CASO CLÍNICO

Uma paciente do sexo feminino, de raça caucasiana, com

42 anos de idade apresentava obesidade e hipotireoidismo primário, sendo por esses motivos acompanhada em consulta de Endocrinologia. Desde há 6 meses referia maior aumento de peso (16 Kg), não associado a alterações dos hábitos alimentares, actividade física ou alteração da medicação.

A paciente tinha antecedentes patológicos de depressão pós-parto e doença bipolar. Apresentava hábitos tabágicos moderados (20 UMA). A sua medicação diária incluía levotiroxina 0,025 mg, escitalopram 20 mg, propranolol 40 mg, ácido valpróico 900 mg, amitriptilina 100 mg e lorazepam 10 mg. Na história familiar existiam antecedentes de depressão, doença bipolar, bócio multinodular e obesidade em vários membros da família; o pai teria tido morte súbita aos 50 anos de idade, sem causa identificada.

Ao exame objectivo apresentava um índice de massa corporal (IMC) de 32,5 Kg/m², com distribuição da gordura preferencialmente abdominal e tensão arterial (TA) de 140/90 mmHg, sentada. Não apresentava edemas, acantose nigricans, estrias violáceas ou outros estigmas endócrinos. Sem outras alterações objectivadas.

No estudo laboratorial verificou-se: tirotrófina (TSH) 3,6 µUI/mL (Valores de Referência (VR):0,4-4,0), tiroxina (T4) livre 1,2 ng/dL (VR:0,8-1,9), glicemia em jejum 108 mg/dL, colesterol total 182 mg/dL (VR:≤190), colesterol LDL 124 mg/dL (VR:<115) e triglicérides 119 mg/dL (VR:<150).

Após 3 meses de dieta hipoglicídica e 30 minutos de caminhada diária, apresentava glicemia em jejum de 106 mg/dL e A1c de 14% (VR:4-6) (por Cromatografia Líquida de Alta Resolução HPLC). Após exclusão de erro laboratorial, reavaliou-se a A1c que demonstrou novamente valor elevado (18,5%). Foram realizados hemograma e estudo do metabolismo do ferro, que se revelaram normais (Quadro I).

O estudo de hemoglobinopatias demonstrou a presença de uma variante X, com perfil de hemoglobinas AXA2: Hb A2 2,1% (VR<2), HbF 0,1% (VR:2-3,5), variante de Hb 13,8 %.

Para esclarecimento da variante encontrada, procedeu-se à sequenciação do gene HBA1. Este revelou uma heterozigotia para a mutação α1 CD40 AAG→AAC (Lis→Asn), que corresponde à variante de hemoglobina Saratoga Springs.

Pelo risco de transmissão familiar, rastrearam-se os familiares para eventual aconselhamento genético.

> DISCUSSÃO

Em 2009, a Associação Americana de Diabetes (ADA), a Federação Internacional de Diabetes (IDF) e a Associa-

Quadro I - Hemograma e metabolismo do ferro.

Parâmetro Analítico	Valor	Valores de Referência
Hemoglobina (Hb)	14,6	11,5-15,5 g/dL
Hematócrito	42,8	37-47 %
Volume Globular Médio	85,4	76-96 fl
Hemoglobina Globular Média	29,2	27-32 pg
Concentração de Hemoglobina Globular Média	34,2	31-35,6 g/dL
Varição do Tamanho Globular	13,1	11-14 %
Reticulócitos	1,52	0-2,5 %

ção Europeia para o Estudo da Diabetes (EASD) recomendaram o uso da A1c para diagnóstico de diabetes, com um valor de corte de 6,5%^[1], tendo a ADA adoptado este critério em 2010^[2].

Tal como foi demonstrado para valores de glicémia plasmática em jejum (GPJ) ≥ 126 mg/dL e glicémia plasmática 2h após prova de tolerância oral a 75g de glicose (GP 2h) ≥ 200 mg/dL, dados epidemiológicos apontam para uma relação entre A1c e complicações microvasculares. O valor de corte de 6,5% está associado a um ponto de inflexão na prevalência de retinopatia, tal como os valores já estabelecidos de GPJ e GP 2h^[3].

Assim como não existe concordância completa entre a GPJ e a GP 2h, também não existe total concordância entre a A1c e qualquer uma das provas glicémicas. A análise do *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES) indica que, assumindo um rastreio universal, uma A1c de 6,5% identifica menos 1/3 de casos de diabetes que uma GPJ de 126 mg/dL^[4]. No entanto, uma grande parte dos doentes com diabetes permanece por diagnosticar. Assim, a baixa sensibilidade da A1c é superada pela sua maior aplicabilidade e conveniência que, podem na realidade aumentar o número de diagnósticos efectuados.

As principais vantagens e desvantagens da A1c como método de diagnóstico, comparativamente aos métodos que utilizam a GPJ ou a GP 2h, apresentam-se no Quadro II^[5].

O valor de A1c depende da capacidade das moléculas de glicose se ligarem de forma covalente, não enzimática, a um resíduo de valina na extremidade N-terminal da cadeia β da hemoglobina, formando glicohemoglobinas. Estas formam-se lenta e continuamente, de forma estável e irreversível, durante os 120 dias de vida dos eritrócitos. A fracção HbA1c é a componente maioritária das glicohemoglobinas. Assim, a A1c reflecte a glicémia média nos 2-3 meses anteriores^[6], correlacionando-se

Quadro II - Vantagens e desvantagens da A1C como método de diagnóstico de diabetes *mellitus*, comparativamente com as determinações de glicémias plasmáticas (GPJ ou GP 2h).

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> · Melhor índice de exposição glicémica · Correlação semelhante em relação ao risco de complicações crónicas · Menor variabilidade biológica ao longo do tempo (<i>stress</i>, intercorrências) · Menor instabilidade pré-analítica · Padronização semelhante ou mesmo superior · Útil na monitorização crónica da eficácia do tratamento · Maior conveniência (sem necessidade de jejum) 	<ul style="list-style-type: none"> · Custo superior · Menor disponibilidade em algumas regiões do mundo · Variabilidade com a raça/etnia · Interferência de alguns factores no doseamento e interpretação <p>· Ver Quadro III</p>

directamente com o risco cardiovascular. Esta glicação altera a estrutura e diminui a carga positiva da hemoglobina A.

O valor de A1C nesta doente foi inesperadamente elevado para a clínica e os valores de glicémia obtidos. Esta discrepância colocou a hipótese de existir um factor de interferência no doseamento de A1C. Além do erro laboratorial, vários factores podem interferir nos resultados originando valores falsos, dependendo do método de doseamento utilizado (Quadro III).

A A1c não reflecte a glicémia de forma fidedigna no caso de anemias e hemoglobinopatias. Em doentes com hemoglobinas anormais, mas com semivida eritrocitária normal, deve ser usado um método de doseamento que não sofra interferência pelas hemoglobinas anormais [8]. Em situações com diminuição da semivida eritrocitária (gravidez, perdas ou transfusões sanguíneas recentes, algumas anemias) o diagnóstico de diabetes deve utilizar apenas os critérios glicémicos.

O método de doseamento da A1C deve ser certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) e padronizado para o doseamento de referência do *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) [9].

Os métodos de doseamento da A1C podem dividir-se em duas categorias [10]:

- 1 - Baseados na carga molecular:
 - a. Cromatografia Líquida de Alta Resolução (troca iónica HPLC);
 - b. Electroforese em gel de agarose.
- 2 - Baseados na estrutura:
 - a. Imunoensaios;
 - b. Cromatografia de afinidade do boronato;
 - c. Espectrometria de massa.

Nos métodos de HPLC e electroforese a A1C pode separar-se da HbA porque a glicação da porção N-terminal diminui a carga positiva. Os métodos baseados na carga podem ser afectados pelas modificações pós-translacionais (p.ex. carbamilação e acetilação) [11] ou pelas mutações da hemoglobina [10] que alteram a sua carga.

No entanto, as características comuns da hemoglobina não interferem no método de HPLC [12].

Os imunoensaios usam anticorpos que se ligam aos aminoácidos glicosilados da porção N-terminal da ca-

Quadro III - Factores de interferência no doseamento de A1C (*adaptado de Pallais JC. N Engl J Med. 2011;364:10*).

Factores que diminuem os níveis de A1C (Falsos negativos)

- Diminuição da idade média eritrocitária
 - Diminuição da sobrevida por hemólise (causas congénitas, imunes, farmacológicas ou patológicas como na coagulação intravascular disseminada ou na malária), doença hepática ou esplenomegália
 - Aumento da percentagem de reticulócitos por terapêutica com eritropoietina, hemorragia ou hemólise
- Transfusões
- Doses elevadas de vitaminas C e E
- Infecção por VIH
- Diálise
- Gravidez

Factores que elevam os níveis de A1C (Falsos positivos)

- Aumento da idade média eritrocitária
 - Aumento da sobrevida eritrocitária por esplenectomia
 - Diminuição da percentagem reticulocitária, como na anemia aplásica
- Défice de ferro
- Idade avançada

Factores com efeitos variáveis nos níveis de A1C (dependentes do método de doseamento utilizado)

- Hemoglobinopatias
- Adição de substâncias à hemoglobina
 - Carbamilação (urémia)
 - Acetilação (salicilatos)
 - Acetaldeído (álcool)
- Hipertrigliceridémia
- Adição de opiáceos
- Variantes potenciais
- Permeabilidade eritrocitária
- Eficiência da glicosilação

deia β para quantificar a A1C. A percentagem de A1C calcula-se a partir das concentrações de hemoglobina e de Hb A1c [10]. Qualquer factor que previna a glicação ou qualquer mutação dos aminoácidos da porção N-terminal, na região do epítopo, que afecte o reconhecimento dos anticorpos, poderá originar falsos resultados. Ainda, os doentes com HbF elevada (>10%) terão um valor falsamente baixo de A1C por imunoensaio, porque a cadeia γ partilha apenas 4 dos primeiros 10 aminoácidos com a cadeia β da Hb A e tem pouco ou nenhuma imunorreactividade com a maioria dos anticorpos usados nos ensaios de HbA1c [10]. Na cromatografia de afinidade do boronato, o ácido bórico reage com os grupos cis diol criados pela glicação, permitindo que as glicohemoglobinas como a A1C sejam separadas da HbA [10]. As variantes de hemoglobina com glicação excessiva podem interferir neste método [13].

A espectrometria de massa mede especificamente a valina glicosilada da porção N-terminal da cadeia β da HbA [14]. A sua utilização está limitada pelos custos e pela complexidade laboratorial necessária.

Em doentes com variantes de hemoglobina, mas com semivida eritrocitária normal, deve ser usado um método de doseamento que não sofra interferência pela variante, de forma a se obter um resultado de A1C fidedigno. Devem fazer-se todos os esforços para identificar a variante e serem usados métodos alternativos ao doseamento de A1C, livres de interferência, para o controlo glicémico (frutosamina, glicémias capilares ou monitorização contínua da glicose) [15].

O método inicialmente usado para analisar a A1C desta doente foi a HPLC, que demonstrou um valor falsamente elevado devido à presença de uma variante de hemoglobina que eluiu na janela da A1C.

O estudo por electroforese de hemoglobinas demonstrou a presença de uma variante. A sequenciação do DNA mostrou uma mutação no gene de globina alfa1 no codão 40, AAG→AAC, correspondendo à alteração $\alpha40(C5)Lys\rightarrow Asn(\alpha1)$ - variante de hemoglobina Saratoga Springs. A posição $\alpha40(C5)$ é um ponto de contacto importante $\alpha1/\beta2$. O resíduo de lisina habitualmente presente nesta posição forma uma ponte salina com a histidina terminal da cadeia β na posição $\beta146(HC3)$, na forma desoxigenada. A substituição da lisina pela asparagina, como acontece na Hb Saratoga Springs, interrompe esta ponte salina Lis-His, favorecendo a forma oxigenada.

Assim, a hemoglobina Saratoga Springs é uma variante com afinidade elevada para o oxigénio, associada a eritrocitose nos seus portadores [16], descrita pela primeira vez em 2003. Resulta de uma substituição de aminoáci-

Quadro IV - Características electroforéticas, imunoeléctricas e cromatográficas da Hemoglobina Saratoga Springs.

Características e comportamento da Hemoglobina Saratoga Springs	
Estabilidade	Estável
Electroforese alcalina, pH 8,6	Separação fraca da HbA
Electroforese em Ágar ácido, pH 6	Sem separação da HbA
Posição imuno-electroforética (mm da HbA)	Separação fraca da HbA (+4,5)
Posição em HPLC	Elui antes da HbA e após a HbF
Electroforese de globinas, alcalina	Separação fraca da αA (12,7)
Electroforese de globinas, ácida	Separação fraca da αA (12,8)
Método de identificação	Sequenciação do DNA; Espectrometria de massa com ionização <i>electrospray</i> (ESI-MS)

dos numa zona de contacto inter-monomérica ($\alpha1/\beta2$), importante nas alterações reversíveis que ocorrem com a oxigenação e desoxigenação.

Esta variante de Hb não se associa a alterações da sobrevivência eritrocitária ou da taxa de glicação, mas apresenta características electroforéticas, imunoeléctricas e cromatográficas típicas, apresentadas na Quadro IV [16]. A espectrofotometria de massa com ionização *electrospray* (ESI-MS) da cadeia anormal de globina alfa mostra uma alteração da massa molecular, relacionada com a substituição de aminoácidos Lis→Asn.

Além da necessidade de alertar para os riscos do tabagismo na presença de uma hemoglobina com elevada afinidade para o oxigénio, fez-se o rastreio da mutação nos familiares, pelo risco de transmissão familiar e permitindo um futuro aconselhamento genético.

> CONCLUSÕES

Quando não há concordância entre a A1C e as glicémias plasmáticas deve pesquisar-se a presença de uma hemoglobinopatia, após exclusão dos factores que diminuem a A1C (falsos negativos), dos factores que aumentam a A1C (falsos positivos) e de outros factores com efeito variável na A1C e que são dependentes do método de doseamento que foi utilizado.

O caso clínico apresentado comprova a presença de uma variante de hemoglobina, a Hemoglobina Saratoga Springs [mutação $\alpha40(C5)Lys\rightarrow Asn(\alpha1)$] com interferência no doseamento de A1C por HPLC, originando resultados falsos positivos. <

Agradecimentos

À Dr.^a Maria Leticia Ribeiro, do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, CHC - CHUC, EPE, pela realização e disponibilização do estudo genético das hemoglobinas.

BIBLIOGRAFIA

1. The International Expert C. International Expert Committee Report on the Role of the A1c Assay in the Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care*. 2009; 32(7): 1327-34.
2. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes 2010. *Diabetes Care*. 2010; 33(Supplement 1): S11-S61.
3. Colagiuri S, Lee C, Wong T, Balkau B, Shaw J, Borch-Johnsen K, et al. Glycemic Thresholds for Diabetes-Specific Retinopathy: Implications for diagnostic criteria for diabetes. *Diabetes Care*. 2011; 34(1): 145-50.
4. Cowie C, Rust K, Byrd-Holt D, Gregg E, Ford E, Geiss L, et al. Prevalence of Diabetes and High Risk for Diabetes Using A1c Criteria in the U.S. Population in 1988–2006. *Diabetes Care*. 2010; 33(3): 562-8.
5. Saraiva J, Gomes L, Carvalheiro M. *Revista Portuguesa de Diabetes*. 2010; 5 (2): 77-82.
6. Nathan D, Turgeon H, Regan S. Relationship between glycated haemoglobin levels and mean glucose levels over time. *Diabetologia*. 2007 Nov; 50(11): 2239-44.
7. Pallais J, Mackool B, Pitman M. Case 7-2011: A 52-Year-Old Man with Upper Respiratory Symptoms and Low Oxygen Saturation Levels. *N Engl J Med*. 2011; 364:957-66.
8. HbA1c Assay Interferences. HbA1c methods: Effects of Hemoglobin Variants (HbC, HbS, HbE and HbD traits) and Elevated Fetal Hemoglobin (HbF). <http://www.ngsp.org/interf.asp>. Updated August 2012.
9. Little R, Rohlfing C, Wiedmeyer H, et al. The national glycohemoglobin standardization program: a five-year progress report. *Clin Chem*. 2001; 47: 1985-1992.
10. Bry L, Chen P, Sacks D. Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivatives on assays for glycohemoglobin. *Clin Chem*. 2001; 47: 153-63.
11. Weykamp C, Penders T, Siebelder C, Muskiet F, 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.
12. Mongia SK, Little RR, Rohlfing CL, Hanson S, Roberts RF, Owen WE, et al. Effects of hemoglobin C and S traits on fourteen commercial glycosylated hemoglobin assays. *Am J Clin Pathol*. 2008; 130: 136-40.
13. Ohba Y, Miyaji T, Murakami M, Kadowaki S, Fujita T, Oimomi M, et al. Hb Himeji or beta 140 (H18) Ala-Asp. A slightly unstable hemoglobin with increased beta N-terminal glycation. *Hemoglobin*. 1986; 10: 109-25.
14. Jeppsson J, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, et al. Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med*. 2002; 40: 78-89.
15. Position Statement: American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*. 2013; 36(Suppl 1): S67-S74.
16. Hoyer et al. Three New Hemoglobin Variants with Abnormal Oxygen Affinity: Hb Saratoga Springs [α 40(C5)Lys→Asn (α 1)], Hb Santa Clara [β 97(FG4)His→Asn], and Hb Sparta [β 103(G5)Phe→Val]. *Hemoglobin*. 2003; 27(4): 235-241.