



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – MACPro**

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE PARA A
DOSAGEM DE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C) PELO MÉTODO DE
CROMATOGRÁFIA DE AFINIDADE AO BORONATO.**

ORLANDO PEREIRA AMADOR NETO

Belém – Pará

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS – MACPro

ORLANDO PEREIRA AMADOR NETO

**ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE PARA A
DOSAGEM DE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C) PELO MÉTODO DE
CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE AO BORONATO.**

Dissertação apresentada na forma de **artigo científico**, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas pelo programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas (MACPro), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

Belém – Pará

2015

ORLANDO PEREIRA AMADOR NETO

ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA AMOSTRA DE SANGUE PARA A DOSAGEM DE HEMOGLOBINA GLICADA (A1C) PELO MÉTODO DE CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE AO BORONATO.

Dissertação apresentada na forma de artigo científico, como requisito para a obtenção do grau de Mestre em Análises Clínicas pelo programa de Mestrado Profissional em Análises Clínicas (MACPro), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira

Banca Examinadora: Prof^a Dr^a Greice de Lemos Cardoso.

Prof. Dr. Moisés Hamoy.

Prof^a Dr^a Vanessa Joia de Mello.

Prof^a Dr^a Rita de Cássia Mousinho Ribeiro

Belém, 30 de julho de 2015

“Nossa dor não advém das coisas vividas, mas das coisas que foram sonhadas e não se cumpriram”

Carlos Drummond de Andrade

Dedico este trabalho a meus
filhos, João Pedro, João Marcelo
e João Henrique.

AGRADECIMENTOS

A Deus por agradecer-me com uma nova vida e uma vida nova.

Ao meu orientador Prof. Dr. José Ricardo dos Santos Vieira, por compartilhar seus conhecimentos com carinho, respeito e paciência.

A Coordenação e professores do Mestrado Profissional em Análises Clínicas da UFPA que conheci durante o mestrado, em especial ao Prof. Dr. José Alexandre Rodrigues Lemos.

A Universidade Federal do Pará pelas oportunidades concedidas em minha história desde a graduação.

Aos servidores e estagiários do Laboratório de Análises Clínicas do ICB-UFPA.

A Dr^a Vera Lucia Reis Souza de Barros, pesquisadora do Instituto Evandro Chagas, pela ajuda no início do mestrado.

A minha família, minha mãe Maria Helena, meu irmão Messias, minha sogra Lindalva e minha esposa, amiga e companheira Kelly Cristine.

ARTIGO CIENTÍFICO A SER SUBMETIDO COMO ARTIGO ORIGINAL À REVISTA ARQUIVOS BRASILEIROS DE ENDOCRINOLOGIA & METABOLOGIA (Versão *on line* - ISBN 1677-9487 – QUALIS B1 – INTERDISCIPLINAR)

Análise da estabilidade da amostra de sangue para a dosagem de hemoglobina glicada (A1C) pelo método de cromatografia de afinidade ao boronato.

Orlando Pereira Amador Neto (1)

Nelma Cristina Sousa de Assis Siqueira (2)

José Ricardo dos Santos Vieira (3)

(1) Farmacêutico, mestrando em Análises Clínicas, UFPA.

(2) Biomédica, mestranda em Análises Clínicas, UFPA.

(3) Farmacêutico, Doutor em Genética e Biologia Molecular, UFPA.

Autor para correspondência:

Neto OPA

Conj. Cidade Nova 9, WE 5B, no. 42 – Coqueiro

Ananindeua (PA) – CEP 67.130-170

E-mail: orlandoneto@ufpa.br

RESUMO

Objetivos: avaliar a estabilidade da amostra de sangue total para dosagem de hemoglobina glicada (A1c) em equipamento portátil pelo método da cromatografia de afinidade ao boronato em química seca, para elaborar protocolos de análise, armazenamento e transporte da amostra. **Metodologia:** uma amostra de sangue total com EDTA foi dosada em triplicada e aliquotada para armazenamento em diferentes temperaturas (em 0°C, 8°C, -20°C) e com intervalos de tempo distintos (24h, 48h, 72h, 96h, 120h) e (30, 60 e 90 dias para a temperatura de -70°C). **Resultados:** as dosagens obtiveram melhor performance de reprodutibilidade quando armazenados na temperatura de 8°C por até 120h, observando-se um aumento dos valores nas demais temperaturas de armazenamento. **Conclusão:** o teste é confiável usando sangue total quando armazenado em refrigeração por 5 dias.

Palavra-chaves: afinidade ao boronato; A1c; diabetes mellitus.

ABSTRACT

Objectives: To evaluate the stability of the whole blood sample for measurement of glycated hemoglobin (A1c) by boronate affinity in portable equipment. Analysis protocols develop, storage and transportation of the sample. **Methodology:** A whole blood sample with EDTA was measured in triplicate and aliquoted for storage at different temperatures (0°C to 8° C, -20°C) and for different time intervals (24h, 48h, 72h, 96h, 120h) and (30, 60 and 90 days at the temperature -70°C). **Results:** The dosages obtained better performance reproducibility when stored at a temperature of 8°C for up to 120h, observing an increase in values in the other storage temperatures. **Conclusion:** the test is reliable using whole blood when stored under refrigeration for 5 days..

Key word: boronate affinity; A1c; diabetes mellitus.

Introdução

Diabetes mellitus (DM) é um distúrbio metabólico com múltiplas etiologias, caracterizada por hiperglicemia crônica em jejum (> 126 mg/dL), associada a defeitos na produção ou ação da insulina, ou ambos (1-3). A classificação mais aceita é a proposta pela *American Diabetes Association* (ADA) como tipo 1 (DM1), tipo 2 (DM2), outros tipos de DM e diabetes gestacional (4). A DM pode ser identificada, precocemente, como pré-diabetes quando detectada hiperglicemia variável entre 100 e 126 mg/dL (tolerância à glicose diminuída ou glicemia de jejum alterada) (5).

A hemoglobina glicada (A1c) é um marcador de DM que vem sendo empregado desde 1976 de acordo com estudos que mostram que níveis elevados de A1c aumentam a probabilidade de complicações microvasculares em diversos órgãos (6). A A1c refere-se à fração de hemoglobina A (HbA), cujo terminal valina da cadeia beta liga-se à glicose por meio de uma reação estável e irreversível. Transportadores existentes na membrana dos eritrócitos são capazes de equilibrar a concentração de glicose intracelular e plasmática, de forma que, a hemoglobina sempre esteja exposta à glicose presente no sangue, independentemente de sua osmolaridade (6-8).

A utilização da A1c para fins diagnósticos de DM foi estabelecida por uma comissão internacional de especialistas em 2009, sendo definido o valor acima de 6,5%, confirmado em uma segunda dosagem, reconhecido pela Organização Mundial de Saúde em 2011(9-15). A partir da dosagem da A1c, a glicemia média estimada (GME) pode ser calculada para um período de 2 a 3 meses anteriores à dosagem pela fórmula $GME = (28,7 \times \%A1c) - 46,7$ (15-17).

Em estudos epidemiológicos sobre DM, a dosagem de glicose capilar e mesmo a determinação da glicose em jejum, estão sujeitas a erros amostrais que variam desde o não cumprimento do jejum, até procedimentos de armazenamento e transporte da amostra, pois a glicose é rapidamente degradada em amostras biológicas seja pelos eritrócitos ou eventuais contaminantes (18). Alternativamente, a determinação da A1c tem sido recomendada para o diagnóstico preciso de DM (2-3) e a metodologia considerada “padrão-ouro” é a do *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) (19-20).

Mais de 30 métodos são descritos para análises de A1c, que podem ser divididos em métodos que usam a carga molecular (HPLC e eletroforese) e aqueles baseados na

estrutura molecular (imunoensaios, cromatografia de afinidade ao boronato e espectrometria de massa) (21-23). Entretanto, a maioria destes, ainda são de alto custo e de complexa tecnologia para estudos *in loco* em comunidades distantes dos centros urbanos. Situação evidente em nossa região, como o caso de populações ribeirinhas amazônicas, remanescentes de quilombos e indígenas.

Buscando-se evitar erros na interpretação dos níveis de A1c obtidos pelos diversos métodos laboratoriais, foi criado, nos Estados Unidos da América, o *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) entidade que promove a padronização das determinações do teste de A1c em relação ao método utilizado, fornecendo uma lista de métodos certificados, visto que, referem-se especificamente a fração A1c (24).

Destarte, este estudo propõe avaliar a estabilidade da amostra de sangue total para dosagem de A1c pelo equipamento Nycocard© II (Axis Shield PoC As®, Scotland) que utiliza cromatografia de afinidade ao boronato em química seca. Este equipamento é portátil, de custo reduzido, de fácil manuseio, sendo um teste rápido, adaptado para pesquisas em campo. Assim, poderão ser sugeridos protocolos de análise e/ou armazenamento e transporte da amostra de sangue para dosagens de A1c, com relevância para o diagnóstico e monitoramento de DM.

Metodologia

Os testes para determinação da A1c foram feitos utilizando-se o equipamento NycoCard© II (Axis Shield PoC As®, Scotland) que corresponde a cromatografia de afinidade ao boronato em química seca, com registro e autorização junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Ministério da Saúde. O equipamento funciona com dispositivos de análise compostos por filtro de membrana porosa, solução tampão de glicinamida com boronato (Reagente 1) e solução tampão de morfolina NaCl (Reagente 2). Os kits para o aparelho são comercializados em embalagens contendo 24 análises. Os resultados foram expressos em percentagem de A1c presente na amostra, proporcional à intensidade de cor azul medida pelo equipamento. Foram realizadas as dosagens de A1c em sangue total em todas as alíquotas após armazenamento em diferentes temperaturas e com intervalos de tempo distintos.

No processamento das alíquotas para determinação da A1c, foram respeitadas as instruções de uso do fabricante, evitando possíveis alterações na leitura pelo equipamento ou efeitos de interferentes presentes na amostra. A tecnologia utilizada corrige concentrações de hemoglobina (Hb) no intervalo de 6 a 18g/100mL onde dosagens de A1c com valores elevados de glicose, bilirrubina e lipídios não sofrem interferência.

A amostra de sangue total foi obtida a partir de um indivíduo adulto, não diabético, que utilizou o serviço do Laboratório de Análises Clínicas (LAC) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA), Brasil. Foram coletados 5 mL de sangue total em tubo de ensaio à vácuo, contendo EDTA. Foi realizada a dosagem de A1c a temperatura ambiente, em triplicata, para servir de parâmetro, representando o dia zero (valor esperado). A amostra não estava hemolisada, pois segundo o manual do equipamento Hb plasmática > 3g/100mL interfere no sistema de teste. Alíquotas de 100µL foram dispensadas em 18 microtubos de polipropileno resistente ao congelamento e armazenadas em 4 ambientes de conservação da seguinte forma: 5 alíquotas em recipiente de isopor com gelo; 5 alíquotas em refrigerador (2 a 8°C); 5 alíquotas em freezer (-20°C); e 3 alíquotas no ultra-freezer (-70°C). Os testes ocorreram em triplicata para cada alíquota, obedecendo aos intervalos descritos na Figura 1.

Os valores das A1c das alíquotas foram comparados com a dosagem do dia zero (valor esperado) para avaliar a reprodutibilidade dos resultados. As análises de triplicata foram tratadas fornecendo a média aritmética, desvio padrão e coeficiente de variação. Os resultados também foram aplicados em análises de significância pelo Teste-t de Student para avaliação da reprodutibilidade das dosagens em triplicata e o teste de regressão logística de Pearson para avaliar a significância da relação entre um aumento ou queda dos valores em função do tempo nas várias temperaturas de armazenamento. Para as análises estatísticas, foi empregando o software BIOESTAT 5.0 (Ayres *et al.*, 2007) sendo admitido como significativo um valor $p < 0,05$.

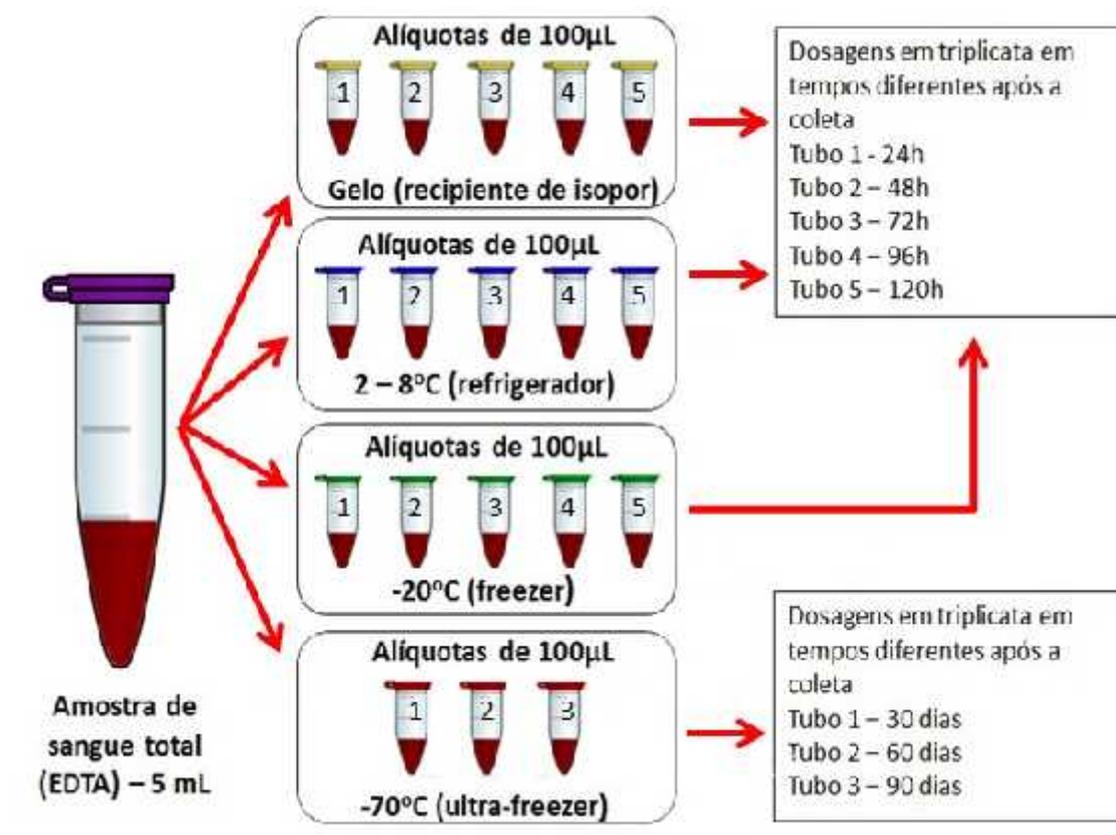


Figura 1 – Protocolo das análises em diferentes temperaturas e tempo de armazenamento.

Resultados e Discussão

As dosagens mostraram-se reprodutivas na maioria das dosagens em triplicata, em todas as temperaturas de armazenamento, com valores significativos indicando que os valores das dosagens não variaram entre si, exceto na dosagem após 24h armazenado em gelo e freezer, 48h em freezer e 96h sob refrigeração e freezer (Tabela 1).

As amostras armazenadas sob refrigeração e em freezer mostraram a melhor performance de reprodutibilidade não havendo diferenças estatísticas entre os dias, apesar do resultado do armazenamento em freezer ter mostrado um resultado limítrofe ($p = 0,059$) no teste de regressão logística (Figura 2). As amostras armazenadas sob refrigeração mostraram, seguramente, maior reprodutibilidade não demonstrando diferença estatística significativa ($p = 0,129$). Por outro lado, as amostras armazenadas no

gelo e no ultra-freezer mostraram um aumento significativo com o passar do tempo, indicando que essas condições de temperatura não são recomendadas.

Tabela 1 – Variação da A1c em temperaturas e diferentes tempo de armazenamento.

Condições de armazenamento		A1c (triplicata)			Média	DP	CV %	Valor p*
T (°C)	Tempo							
TA	0h	6,6	6,2	6,4	6,4	0,20	3,1	0,0067
Gelo (0°C)	24h	6,8	6,4	5,6	6,26	0,61	9,7	0,0695
	48h	6,9	6,7	6,2	6,6	0,36	5,5	0,0165
	72h	5,9	6,2	6,3	6,13	0,21	3,4	0,0111
	96h	7,0	6,7	6,5	6,73	0,25	3,7	0,0070
	120h	6,4	6,4	6,4	6,4	1,09	170	-
Refrigeração (8°C)	24h	6,4	6,4	6,4	6,4	1,09	170	-
	48h	6,5	6,3	6,4	6,4	0,10	1,5	<0,0001
	72h	6,5	6,5	6,5	6,5	-	-	-
	96h	4,9	5,2	6,0	5,36	0,59	10	0,3802
	120h	6,1	6,3	6,1	6,16	0,12	1,8	<0,0001
Freezer (-20°C)	24h	5,2	5,6	5,4	5,4	0,20	3,7	0,0741
	48h	4,8	5,1	5,6	5,16	0,40	7,8	0,5491
	72h	6,8	7,0	6,8	6,86	0,12	1,6	<0,0001
	96h	7,7	5,2	6,6	6,5	12,51	19,2	0,1738
	120h	5,6	5,5	5,9	5,66	0,21	3,6	0,0310
Ultra freezer (-70°C)	30 dias	7,7	7,3	7,6	7,53	0,21	2,7	<0,0001
	60 dias	7,4	7,4	7,2	7,33	0,12	1,5	<0,0001
	90 dias	7,9	7,8	7,8	7,83	0,06	0,7	<0,0001

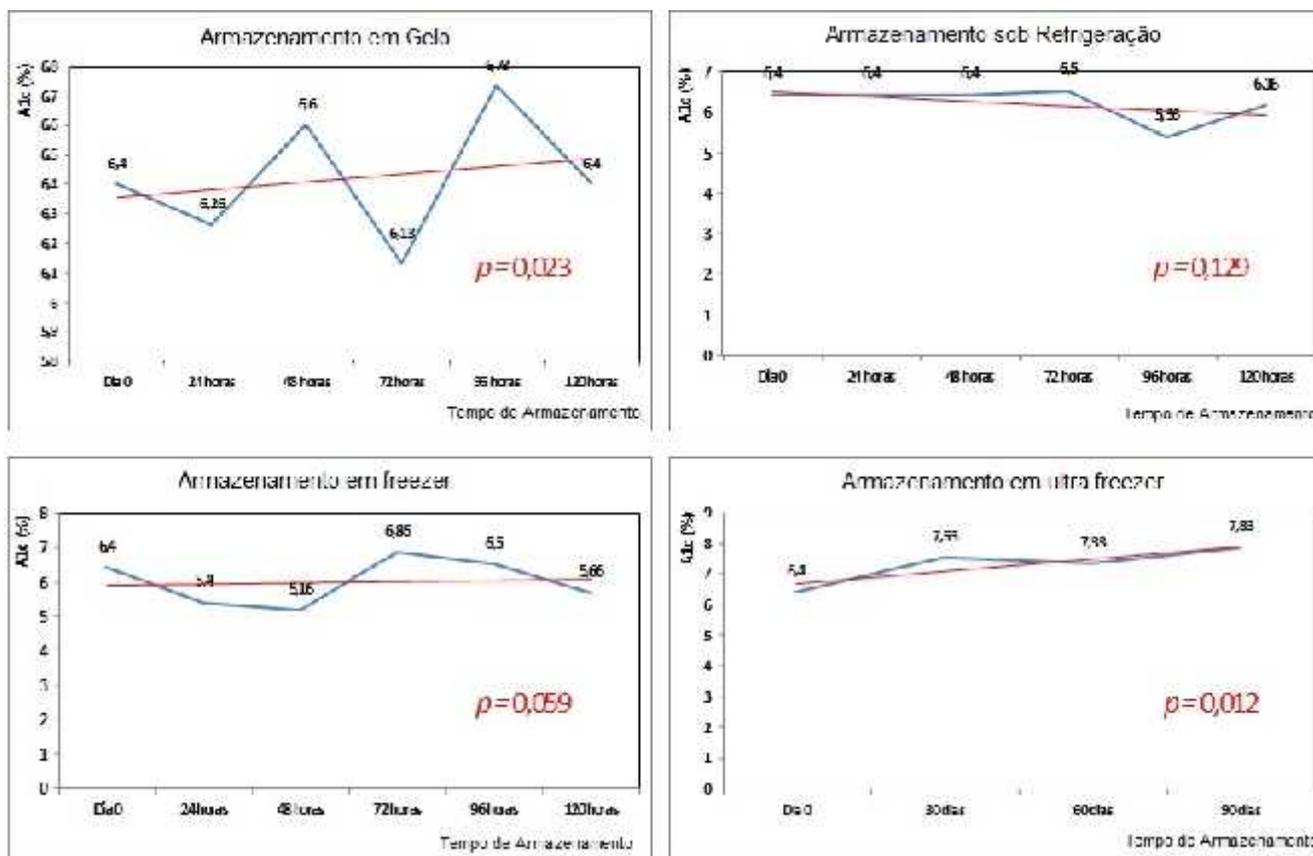
* Teste t-Student.

CV = coeficiente de variação; DP = desvio padrão; T = Temperatura TA = Temperatura ambiente.

Foi observado um aumento na viscosidade da alíquota referente ao ambiente refrigerador 96h, fato que pode ter provocado valores inferiores em relação ao dia zero. Embora nossa metodologia seja um teste rápido, em média 3 minutos, as dosagens correspondentes ao ambiente freezer 48h sofreram demora na absorção do reagente 2 (solução de lavagem), sugerindo possível instabilidade da amostra.

Em trabalho utilizando as metodologias de imunoensaio e HPLC com amostras de sangue conservadas em diferentes temperaturas, analisadas em dias subsequentes, foi observada estabilidade a -20°C e 4°C, respectivamente, sendo que nenhum método verificou estabilidade com amostra a 30°C ou 37°C por mais de 3 dias (25). Trabalhos realizados sobre a estabilidade de amostras armazenadas por longos períodos em baixas temperaturas, mostram que há aumento na concentração das frações de HbA1a e HbA1b

(10), o que foi confirmado no presente trabalho nas dosagens das alíquotas de 30, 60 e 90 dias armazenadas no ultra-freezer.



* Teste de regressão logística de Pearson

Figura 2 - Variação da A1c em função do tempo e temperatura de armazenamento.

Conclusão

A A1c como importante fator diagnóstico de DM, deve ser controlada por métodos que sejam reprodutivos e estáveis quando a amostra é armazenada vários dias antes da dosagem como no caso de trabalhos *in loco* em regiões distantes de centros urbanos. O método de dosagem de A1c pelo método da cromatografia de afinidade ao boronato mostrou-se reprodutiva quando a amostra foi armazenada sob refrigeração (8°C) ou freezer (-20°C). O armazenamento em freezer (-20°C) e ultra-freezer (-70°C) mostraram-se inadequados por aumentar os valores das dosagens com o passar do tempo.

A elaboração de protocolos de armazenamento de amostras e padronização para dosagens de afinidade ao boronato em equipamento portátil em pesquisas epidemiológicas *in loco*, são de grande relevância para saúde pública e necessárias para avanços e inovações tecnológicas. O presente ensaio de estabilidade da amostra em

diferentes temperatura e intervalos de tempo demonstrou boa acurácia, apresentando o ambiente refrigerador com os resultados mais próximos do valor esperado.

Referências

- 1- Kharroubi AT, Darwish HM. Diabetes mellitus: The epidemic of the century. *World J Diabetes* 2015 June 25; 6(6): 850-867.
- 2- Nandini A. et al. Correlation between Glycated haemoglobin and glucose testing of diabetes mellitus screening. *Indian Journal of Medical Sciences* 2013 jul (67.7) :p 149.
- 3- Karakaya J, Akin S, Karagaoglu E, Gurlek A. The performance of hemoglobin A1c against fasting plasma glucose and oral glucose tolerance test in detecting prediabetes and diabetes. *Journal of Research in Medical Sciences* 2014 nov; 19(11): 1051-1057.
- 4- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014; 37(1): 81-90.
- 5- Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes: 2013-2014/Sociedade Brasileira de Diabetes; [organização José Egidio Paulo de Oliveira, Sérgio Vencio]. – São Paulo: AC Farmacêutica, 2014.
- 6- Muktabhant et al. Use of glucometer and fasting blood glucose as screening tool for diabetes mellitus type 2 and glycated haemoglobin as clinical reference in rural community primary care settings of a middle income country. *BMC Public Health* 2012; 12:349.
- 7- Keltanen T., Sajantila A., Valonen T., Vanhala T., Lindroos K, Measuring postmortem glycated hemoglobin – A comparison of three methods. *Legal Medicine* 15 (2013) 72–78.
- 8- Nelson DL, Cox M. *Lehninger – Princípios de Bioquímica*. 5ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. p. 242.
- 9- Hsieh K-M. et al , Glycated hemoglobin(HbA1c) affinity biosensors with ring-shaped interdigital electrodes on impedance measurement. *Biosensors and Bioelectronics* 49(2013) 450–456.

- 10- Netto AP, Andriolo A, Filho FF, Tambasci M, Gomes MB, Melo M, Sumita NM, Lyra R, Cavalcanti S. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. 2009. J Bras Patol Med Lab 45(1): 31-48.
- 11- Sumita NM. As interferências e as limitações metodológicas na dosagem da hemoglobina glicada (A1C). 2012. J Bras Patol Med Lab 48(5):312-313.
- 12- Wu T. et al. Effects of glucose and blood pressure control on diabetic kidney disease in old patients with type 2 diabetes. Journal Diabetology & Metabolic Syndrome 2014, 6:81.
- 13- Sacks DB, John WG, Interpretation of hemoglobina A1c values. Journal American Medical Association 2014; 311(22):2271-2272.
- 14- Liotta L, Di Franco A, Pazzagali M, Luconi M. Glycated hemoglobina (HbA1c) measurement in frozen whole blood depends on baseline values of fresh samples. Analytical and Bioanalytical Chemistry 2013 jan 405.1:429-434.
- 15- World Health Organization 2011. Use of Glycated Haemoglobin (HbA1c) in the Diagnosis of Diabetes Mellitus. Disponível em:
http://www.who.int/diabetes/publications/Definition%20and%20diagnosis%20of%20diabetes_new.pdf.
Acesso em 15 de julho de 2015.
- 16- American Diabetes Association. Standards of medical care in diabetes – 2010. Diabetes Care. January 2010; 33:S11-S61.
- 17- Nathan DM, Kuenen J, Borg R, Zheng H, Schoenfeld D, Heine RJ. A1c Derived Average Glucose Study Group. Translating the A1c assay into estimated average glucose values. Diabetes Care. 2008; 31:1473-8.
- 18- Keramati et al. Comparability of hemoglobin A1c level measured in capillary versus venous blood sample applying two point-of-care instruments. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders 2014, 13:94.

- 19- Ucar F, Estimation of biological variation and reference change value of glycated hemoglobin (HbA1c) when two analytical methods are used. *Clinical Biochemistry* 46 (2013) 1548–1553.
- 20- Menezes MGS, Couto FD, Júnior LSS, Adorno EV, Barbosa CG, Gonçalves MS, Couto RD. Determinação de HbA1c por CLAE: interferência de variantes de hemoglobinas S e C e alta concentração de HbF. 2012. *J Bras Patol Med Lab* 48(5): 337-344.
- 21- Sofronescu AG, Williams LM, Andrews DM, Zhul Y. Unexpected hemoglobin A1c results. *Journal American Association for Clinical Chemistry*. 2011; 57:2, 153-156.
- 22- Das K, Krzyzanowski G.D., Wigginton S.M, Lechner JM, Ryan W.L. Evaluation of the performance and stability of a novel A1c-Cellular Control. *Journal of Diabetes Science and Technology* 2012 vol: 6 Iss:2 p:483-485.
- 23- Pundir CS, Chawla S. Determination of glycated hemoglobin with special emphasis on biosensing methods. *Analytical Biochemistry* 444 (2014) 47–56.
- 24- National Glycohemoglobin Standardization Program. Disponível em: <http://www.ngsp.org/prog/index.html> Acesso em 15 de julho de 2015.
- 25- Curt LR, Hanson S, Tennill AL, Randie RL. Effects of whole blood storage on hemoglobin A1C measurements with five current assay methods. *Diabetes Technology & Therapeutics*, march 2012, 14(3) 271-275.