

MÉTODOS UTILIZADOS NA DOSAGEM DE HEMOGLOBINA GLICADA E A SUA IMPORTÂNCIA NA PREVENÇÃO DE COMPLICAÇÕES CRÔNICAS DO DIABETES MELLITUS

Juliana Kunde¹ & Andreza Fabro de Bem²

RESUMO - A publicação de grandes estudos prospectivos sobre a evolução de complicações crônicas em pacientes com Diabetes *mellitus*, comprovaram a relação entre o risco de complicações macro e microvasculares e o controle glicêmico. A quantificação de hemoglobina glicada fornece subsídios para a avaliação clínica do controle glicêmico em longo prazo. Muitos métodos estão sendo usados nos laboratórios clínicos para a determinação dos níveis de hemoglobina glicada, porém a carência de padronização limita o uso destes métodos e dificulta a comparação inter-laboratorial de resultados. O objetivo deste artigo é discutir conceitos sobre a hemoglobina glicada como um importante marcador para o controle do paciente diabético, beneficiando uma comunidade grande de diabéticos e por extensão toda a sociedade.

PALAVRAS-CHAVE : Diabetes *mellitus*, Hemoglobina Glicada, Complicações Crônicas, Métodos de Ensaio

ABSTRACT - The publication of the prospective studies about the evolution of the chronic diseases with Diabetes *mellitus* patients show the relationship between the risk of complications on a micro and macro vascular and the glucose levels control. The quantification of glycated hemoglobin levels give evidence of clinical evaluation at long term control of glucose levels. Several methods have been used in clinical laboratories for the quantification of glycated hemoglobin but the lack of the standardization methods reduce the use of these and makes it difficult to compare inter-laboratorial results. The purpose of this article is to discuss the importance of using glycated hemoglobin concepts, as a marker for the diabetes patients control. The use of this test is going to benefit the diabetes community and the whole society.

KEYWORDS : Diabetes *mellitus*, Glycated Hemoglobin, Chronic Complications, Methods of assay

¹ Farmacêutica Bioquímica do Laboratório Fischer - Aluna do Curso de Especialização em Laboratório Clínico – ² Professora de Bioquímica Clínica - Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Universidade Federal de Santa Maria - RS

1. INTRODUÇÃO

O Diabetes *mellitus* é uma síndrome de etiologia múltipla, decorrente da falta de insulina e/ou da incapacidade da insulina de exercer adequadamente seus efeitos¹⁹. É uma situação clínica frequente, acometendo cerca de 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos¹⁶ e 0,3% das gestantes².

Em 1997, a Associação Americana de Diabetes (ADA) apresentou novas recomendações sobre o diagnóstico e classificação do Diabetes *mellitus*²², que são revisadas anualmente³. O método diagnóstico recomendado é a dosagem de glicemia em jejum, e o teste de tolerância à glicose em algumas circunstâncias. Em consenso recente da ADA, o limite máximo da normalidade da glicemia de jejum passa a ser de 99 mg/dL, sendo que a glicemia de jejum inapropriada (pré-diabetes), está definida entre 100 e 125 mg/dL¹⁰.

As consequências do Diabetes *mellitus* a longo prazo, acontecem devido alterações micro e macrovasculares que levam a disfunção, dano ou falência de vários órgãos. As complicações crônicas compreendem a nefropatia, com possível evolução para insuficiência renal, a retinopatia, com possibilidade de cegueira, a neuropatia, com risco de úlceras nos pés, amputações, artropatia de Charcot e manifestações de disfunção autonômica, incluindo disfunção sexual. Pessoas com diabetes apresentam elevado risco de doença vascular aterosclerótica, como doença coronariana, doença arterial periférica e doença vascular cerebral¹⁹.

A dosagem da glicose no sangue não constitui parâmetro eficiente para avaliação do controle da glicemia durante um intervalo de tempo prolongado. Neste sentido, a dosagem da hemoglobina glicada tem papel fundamental na monitorização do controle glicêmico em pacientes diabéticos, pois fornece informações acerca do índice retrospectivo da glicose plasmática^{7,8,21,24,29}. A grande vantagem da hemoglobina glicada está no fato de não sofrer grandes flutuações como na dosagem da glicose plasmática, bem como estar diretamente relacionada ao risco de complicações em pacientes com Diabetes *mellitus* tipo 1 e tipo 2⁸.

Do ponto de vista metodológico, a dosagem de hemoglobina glicada evoluiu consideravelmente, desde o início de seu uso em rotina diagnóstica. No princípio, os métodos disponíveis baseavam-se em cromatografia de troca iônica, que apresentavam como inconvenientes uma grande dependência da temperatura ambiente e da qualidade dos tampões e a interferência de hemoglobinas anormais (S,C, etc.). A seguir, desenvolveram-se métodos mais estáveis, baseados na cromatografia de afinidade, que apresentavam, entretanto, dificuldades de automação e uso intensivo de mão de obra, o que ocasiona, em consequência, uma reprodutibilidade longe da ideal³⁰. Uma dosagem precisa e reprodutível da hemoglobina glicada é de fundamental importância, principalmente quando se pretende usá-la como base para variações em regimes de terapia intensiva e tem sido uma preocupação constante descrita na literatura recente^{9,24,30}.

Os métodos baseados em cromatografia líquida de alta performance (HPLC) apresentam o potencial de automação e a reprodutibilidade desejáveis. Em função disto, o estudo do *Diabetes Control and Complications Trial* - DCCT⁸ adotou o HPLC como a metodologia de referência.

2. COMPLICAÇÕES DO DIABETES MELLITUS

As complicações crônicas do Diabetes *mellitus* são as principais responsáveis pela morbidade e mortalidade dos pacientes diabéticos. As doenças cardiovasculares representam a principal causa de morte (52%) em pacientes diabéticos do tipo 2¹⁸.

A estratégia de prevenção das complicações crônicas do diabetes baseia-se no controle da hiperglicemia para tratamento precoce de suas complicações. É consenso a necessidade da manutenção de um controle glicêmico satisfatório em todos os pacientes, isto é, um grau de controle que previna a sintomatologia aguda e crônica atribuída à hiperglicemia e à hipoglicemia⁶.

No diabetes tipo 1, este controle glicêmico satisfatório é capaz de prevenir/retardar complicações microvasculares e neuropáticas, como demonstrado pelos dados do DCCT⁸. Este estudo acompanhou 1441 indivíduos com diabetes tipo 1, randomizados em dois grupos – um grupo com tratamento insulínico intensivo (3 ou mais injeções diárias de insulina) e outro grupo em tratamento convencional (1 a 2 injeções de insulina por dia). Após 6,5 anos, o estudo demonstrou que o tratamento intensivo viabiliza um controle satisfatório com níveis médios de hemoglobina glicada de 7%, prevenindo o aparecimento e reduzindo a progressão da nefropatia, retinopatia e neuropatia diabéticas, quando comparado com o controle obtido pelo tratamento convencional no qual os níveis de hemoglobina glicada são em média 9%.

A nefropatia está presente em 15 a 20% dos pacientes com diabetes tipo 2 e em 30 a 40% dos diabéticos tipo 1 com longa evolução. Trata-se da principal causa de insuficiência renal em pacientes que fazem diálise²⁰. Os dados combinados do DCCT demonstram que o controle glicêmico satisfatório do diabetes tipo 1 pode reduzir a incidência de microalbuminúria em 39% e de albuminúria em 54%⁸. A retinopatia diabética acomete cerca de 40% dos pacientes diabéticos e é a principal causa de cegueira em pacientes entre 25 e 74 anos¹. O DCCT mostrou que o controle satisfatório da glicemia pode reduzir a incidência de retinopatia em 76% e sua taxa de progressão em 54%⁸. A neuropatia diabética é a complicação mais frequente e precoce do Diabetes *mellitus*, podendo atingir 80 a 100% dos pacientes a longo prazo, sendo retardada pelo controle glicêmico rigoroso. O “pé diabético” é a principal lesão de extremidade, é assim denominado devido às lesões dos pés decorrentes da neuropatia, e principalmente da doença vascular periférica. Pacientes diabéticos têm em torno de 15 vezes maior risco de sofrer amputações que os não diabéticos e 20% dos amputados morrem em 2 anos²⁰.

A glicação não enzimática de proteínas ou reação de Maillard, é um processo ligado a hiperglicemia crônica a qual por sua vez, ocasiona uma série de alterações fisiológicas importantes no desenvolvimento das complicações crônicas do Diabetes⁵. A reação de Maillard é subdividido em três estágios: inicial, intermediário e tardio. No estágio inicial, a glicose (ou outros açúcares redutores como frutose, galactose, manose, xilose) reagem com grupamentos amino livres de várias moléculas, incluindo proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos formando um composto instável chamado base de Schiff. Esta molécula sofre um rearranjo produzindo uma cetoamina estável, o produto de Amadori. Como esta reação não requer a participação de enzimas, as variáveis que regulam os níveis dos produtos glicosilados in vivo são a concentração de glicose e proteína, meia vida da proteína e sua

reatividade com os grupamentos amino. No estado intermediário, através de reações de oxidação e desidratação, os produtos de Amadori são degradados em compostos carbonil (glioal, metilglioal, deoxiglicosa), os quais são muito mais reativos que os açúcares dos quais foram originados, agindo como propagadores de reações com grupamentos amino de várias proteínas, originando de forma irreversível compostos insolúveis, frequentemente fluorescentes, usualmente chamados Produtos Finais de Glicação Avançada (Advanced Glycation End-Products – AGEs), os quais se acumulam no organismo sendo responsáveis pelas complicações crônicas do diabetes¹⁴. Os três mecanismos pelos quais os AGEs causam dano tecidual são: ligação à macromoléculas, interação com receptores específicos, acumulação intracelular²⁷.

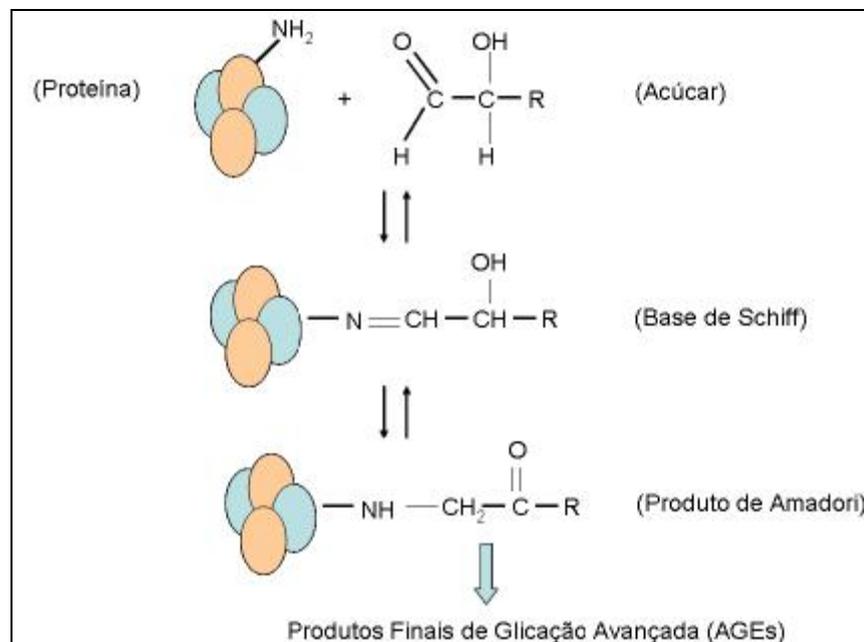


Figura 1 - Estágios da glicação não enzimática das proteínas. (Adaptado de Lapolla et al., 2004)

3. HEMOGLOBINA GLICADA

A determinação dos produtos de glicação (produtos de Amadori) é rotineiramente analisada através da dosagem da hemoglobina glicada a qual é utilizada para avaliação do controle metabólico nos pacientes diabéticos.

A hemoglobina glicada ou HbA_{1c} origina-se por meio de uma reação irreversível entre a glicose sanguínea e o aminoácido valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A. A HbA_{1c} representa aproximadamente 80% da fração das hemoglobinas A₁, também chamadas de rápidas, sendo esta denominação resultado do processo de separação eletroforética²⁵.

Em um indivíduo não-diabético, cerca de 4 a 6% do total de HbA apresenta-se glicada, enquanto que no diabético com descontrole acentuado, esta percentagem pode atingir níveis duas a

três vezes acima do normal²⁵. O objetivo do tratamento de um paciente diabético é manter os níveis de hemoglobina glicada abaixo de 7%¹⁶.

As outras frações da hemoglobina A₁ originam-se da ligação de outros elementos a porção valina N-terminal da cadeia beta da hemoglobina A : A_{1a1} (frutose 1,6-bifosfato), A_{1a2} (frutose 6-fosfato) e A_{1b} (ácido pirúvico). Quando o processo de glicação ocorre em outros pontos da cadeia beta e na cadeia alfa origina-se a molécula de hemoglobina glicada A₀. A somatória de todas as frações da hemoglobina A₁ e A₀ resulta na chamada hemoglobina glicada total²⁵.

No processo de gênese da HbA_{1c}, observa-se à formação de uma base de Schiff denominada também de aldimina ou pré-A_{1c}. O ritmo de formação deste composto é diretamente proporcional à concentração de glicose plasmática, sendo que esta molécula pode dissociar-se ou formar uma cetoamina estável, não mais dissociável, agora denominada de HbA_{1c}²⁵.

Alguns métodos disponíveis no mercado para dosagem da hemoglobina glicada, conseguem separar a fração HbA_{1c} das outras moléculas análogas, ou seja a base de Schiff, a hemoglobina A₀ e as outras frações da hemoglobina A₁. Os métodos que não conseguem caracterizar estes elementos podem, potencialmente, gerar valores não compatíveis com o real estado de controle dos níveis glicêmicos¹².

O nível de hemoglobina glicada é resultado de todas as hemácias circulantes no organismo, desde a mais velha (120 dias) a mais jovem. Porém, a glicose dos últimos 30 dias antes da dosagem da hemoglobina glicada, contribui com praticamente 50% da HbA_{1c}, enquanto os níveis glicêmicos dos últimos 2 a 4 meses contribuem com aproximadamente 25%. Conclui-se desta forma que a hemoglobina glicada reflete, na realidade a média ponderada do níveis glicêmicos de 60 a 90 dias antes do exame^{7,24,25}.

3.1 METODOLOGIAS PARA QUANTIFICAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA

Embora mais de 20 procedimentos diferentes estejam disponíveis para a quantificação da hemoglobina glicada¹³ em termos de rotina laboratorial podemos dividir estas metodologias em dois grandes blocos, segundo o princípio utilizado na separação da fração glicada da não-glicada.

Quadro 1. Principais métodos para quantificar a hemoglobina glicada

Princípio	Métodos	Componente medido
SEPARAÇÃO PELA DIFERENÇA NA CARGA	HPLC (troca iônica)	Hb A _{1c}
	TROCA IONICA (coluna)	Hb A _{1c}
		Hb A ₁
	ELETROFORESE	Hb A _{1c}
Hb A ₁		
SEPARAÇÃO PELA DIFERENÇA ESTRUTURAL	HPLC (afinidade)	Hb glicada total
	AFINIDADE (coluna)	Hb glicada total
	IMUNOENSAIO	Hb A _{1c}

* Fonte : Adaptado de Sacks, 1999.

Como pode ser observado no quadro 1, dependendo da metodologia empregada o resultado poderá refletir por exemplo o total de hemoglobina glicada ou apenas uma das frações glicadas como a HbA_{1c}. Estas diferenças são muito importantes no momento da interpretação dos resultados, bem como na identificação de possíveis interferentes metodológicos.

Na cromatografia por troca iônica, a hemoglobina não glicada apresenta uma carga positiva, ajustando-se o pH do meio reacional, quando comparada a hemoglobina glicada, o que a faz interagir mais com uma coluna catiônica (carga negativa). O fluxo de um tampão adequado na resina permite eluir a fração glicada, portanto separando-a da não glicada pela carga da molécula de hemoglobina¹¹. Esta metodologia está disponível em minicolunas cromatográficas ou em sofisticados sistemas de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Performance) podendo apresentar-se completamente automatizados.

A cromatografia de afinidade utiliza derivados do ácido borônico, como o ácido m-aminofenilborônico, imobilizados em uma resina. O ácido borônico reage com cis dióis (compostos que apresentam duas hidroxilas no mesmo lado, como a molécula de glicose), portanto a separação das frações glicada e não glicada se dá pela porção açúcar, ficando a hemoglobina glicada retida na coluna enquanto a hemoglobina não glicada (ou HbA₀) é eluída da mesma pelo fluxo de um tampão. Este princípio metodológico quantifica primariamente a hemoglobina glicada total¹⁷.

Quadro 2. Comparação entre as principais características dos sistemas cromatográficos de troca iônica e afinidade

Características	Cromatografia por troca iônica	Cromatografia por afinidade
Utilidade clínica	Boa	Boa
Fração quantificada	HbA ₁ ou HbA _{1c}	Hb glicada total (Hb A _{1c} calculada)
Interferência da fração lábil (pré-A _{1c})	Pode ocorrer (passível de eliminação)	Mínima
Susceptibilidade do ensaio a variação de temperatura	Sim	Pouca influência
Interferência por hemoglobinas variantes (com alteração na carga, como Hb S e C)	Sim	Não
Interferência por hemoglobina carbamida, outras drogas que alterem a carga da hemoglobina	Sim	Não
Possibilidade de automação	Sim	Sim

* Fonte : Adaptado de Turpenein, 1995.

As referidas características entre os princípios devem ser analisadas com cautela quando se pretende caracterizar vantagens e desvantagens dos referidos procedimentos. Os sistemas automatizados e semi-automatizados disponíveis possibilitam aos dois processos performances semelhantes em termos de imprecisão (reprodutibilidade, medido pelo Coeficiente de Variação) e

sensibilidade, eliminando também os principais problemas do sistema de troca iônica como a influência da temperatura ambiente sobre a capacidade de ligação da resina e a interferência da fração lábil²⁸.

Os dois princípios metodológicos são diferentes e portanto separam populações de hemoglobinas glicadas diferentes. Na troca iônica a separação ocorre pela carga da molécula de hemoglobina, portanto patologias que alteram a carga da hemoglobina, poderão afetar sua interação com a resina e produzir resultados falsos. Por exemplo hemoglobinopatias, carbamilação da hemoglobina, ou ainda a possibilidade de drogas (como o ácido acetilsalicílico em altas doses) que podem ligar-se a hemoglobina, alterando-lhe a carga. Na cromatografia de afinidade, a separação ocorrendo pela fração açúcar, não sofre influência das hemoglobinas variantes ou de outras alterações na estrutura protéica. No entanto este processo não quantifica uma fração, mas sim o conjunto total das hemoglobinas glicadas.

Os resultados para hemoglobina glicada obtidos pelos métodos de cromatografia de troca iônica e afinidade, embora altamente correlacionados, não são iguais, sendo esta desigualdade muito mais evidente nos pacientes com diabetes mal controladas, quando a glicemia média sanguínea é maior.

PRINCIPAIS INTERFERÊNCIAS NA DETERMINAÇÃO DA HEMOGLOBINA GLICADA

Patologias que alterem a vida média da hemácia (e conseqüentemente da hemoglobina), alteram os resultados de hemoglobina glicada realizado por qualquer metodologia. Portanto este ensaio requer para sua plena interpretação que as hemácias apresentem uma vida média normal. Patologias que reduzam a vida média da hemácia, como as anemias hemolíticas ou estados hemorrágicos, produzem resultados de hemoglobina glicada reduzidos pela presença de número elevado de “hemácias jovens” na circulação; patologias que aumentam a vida média da hemácia, como as anemias por carência de ferro, vitamina B12 ou folatos, produzem resultados de hemoglobina glicada aumentados pela presença de elevado número de “hemácias velhas” na circulação^{24,26}.

A dosagem de hemoglobina glicada em pacientes portadores de hemoglobina variante heterozigótica (exemplos: hemoglobina S, C, Graz, Sherwood, Forest, D, Padoya) resulta valores falsamente elevados ou rebaixados, conforme a metodologia aplicada. O método HPLC pode identificar a presença de hemoglobina anômala, permitindo uma análise mais crítica do resultado obtido, já os métodos de imunoensaio não são capazes de detectar a presença de hemoglobinas variantes^{7,12,23}.

A quantificação da hemoglobina glicada não é aplicável nas hemoglobinopatias homozigóticas, independente da metodologia utilizada, em função da ausência de hemoglobina A. Esta condição necessita ser rastreada e confirmada pelos métodos usuais para o estudo das hemoglobinopatias. Nestas situações, exames alternativos tais como frutossamina e albumina glicada, podem ser úteis^{7,12}.

Hipertrigliceridemia, hiperbilirrubinemia, uremia, alcoolismo crônico, ingestão crônica de salicilatos e opiáceos podem interferir em algumas metodologias, produzindo resultados falsamente

elevados^{7,20,24}. Em pacientes com nefropatias crônicas os resultados da hemoglobina glicada devem ser avaliados com cautela. Se medida como HbA_{1c} por troca iônica, pode sofrer interferência da carbamilação da hemoglobina devido a uremia intensa, e independente do princípio metodológico pela anemia quase sempre presente nestas patologias³¹.

A presença de grandes quantidades de vitamina C e E é descrita como fator que pode induzir resultados falsamente diminuídos por inibirem a glicação da hemoglobina²⁴.

3.2 PONTOS IMPORTANTES A RESSALTAR NO USO CLÍNICO DA HEMOGLOBINA GLICADA

A determinação dos níveis da HbA_{1c} é a melhor opção para a avaliação do controle glicêmico em médio e longo prazo. Entretanto, este processo não é indicado para o diagnóstico do Diabetes *mellitus*^{3,24}.

A hemoglobina glicada deve ser medida rotineiramente em todos os pacientes com Diabetes *mellitus* para documentar o grau de controle glicêmico. As metas de tratamento devem ser baseadas em resultados de estudos clínicos prospectivos e randomizados, tais como DCCT e o UKPDS. Esses estudos mostraram uma correlação entre o controle glicêmico, quantificado por determinações seriadas de HbA_{1c}, e os riscos de desenvolvimento e progressão das complicações crônicas do diabetes^{8,24,29}.

Os testes de HbA_{1c} devem ser realizados pelo menos duas vezes ao ano para todos os pacientes diabéticos e quatro vezes por ano (a cada 3 meses) para pacientes que se submeterem a alterações do esquema terapêutico ou que não estejam atingindo os objetivos recomendados com o tratamento vigente²⁴.

Níveis de HbA_{1c} acima de 7% estão associados a um risco progressivamente maior de complicações crônicas. Por isso, o conceito atual de tratamento do diabetes por objetivos define 7% como o limite superior acima do qual está indicada a revisão do esquema terapêutico em vigor^{8,29}.

Com o intuito de evitar problemas na interpretação dos níveis de HbA_{1c}, os laboratórios médicos devem utilizar os métodos de ensaio certificados pelo National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) com rastreabilidade de desempenho analítico ao método de referência DCCT. Além disso, os laboratórios que dosam a HbA_{1c} devem participar de programas de ensaio de proficiência implementados por entidades oficiais^{8,15,24}.

A metodologia de referência é a cromatografia líquida de alta performance conhecida pela sigla HPLC (high-performance liquid chromatography) ou, em português, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Esta definição apoia-se nos estudos do DCCT e UKPDS^{8,12,24,26}.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos prospectivos de intervenção, DCCT e UKPDS, demonstraram de forma inequívoca que a manutenção de taxas glicêmicas em valores o mais próximo do normal, avaliadas pelo teste de hemoglobina glicada, é acompanhada de redução significativa do surgimento e da progressão das complicações microvasculares, tanto em diabéticos tipo 1 (DCCT)¹⁹, quanto tipo 2 (UKPDS)¹⁶. Neste

sentido, o teste de HbA_{1c} é fundamental no acompanhamento dos diabéticos, sendo que o resultado encontrado é determinante na conduta médica adotada para estes indivíduos. É o exame mais informativo disponível no momento em relação a prevenção de complicações crônicas e no controle do Diabetes *mellitus*.

Dentre os métodos utilizados para a dosagem de hemoglobina glicada, o método de referência é o HPLC, por causa da sua excelente precisão, da boa reprodutibilidade, da baixa influência nos resultados da presença de hemoglobinas anormais, bem como da possibilidade de total automatização.

Como está evidente que a quantificação da hemoglobina glicada é dependente da metodologia empregada em termos da população glicada medida (HbA₁, HbA_{1c}, Hb glicada total), é recomendável que os controles do mesmo paciente diabético sejam realizados sempre no mesmo laboratório ou pelo menos em laboratórios que apresentem metodologias semelhantes. Este procedimento certamente minimizará muitos dos problemas que ocorrem entre laboratório e clínica, os quais podem justificar até uma atual subutilização deste importante marcador em vários centros.

5. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. Aiello L.P.; Gardner, T.W.; King, G.L.; Blankenship, G.; Cavallerano, J:D.; Ferri III; F.L.; Klain,R. **Diabetic retinopathy. Technical review.** Diabetes Care 21: 143-156, 1998.
2. American Diabetes Association. **Gestational diabetes mellitus. Clinical Practice Recommendations** 2001. Diabetes Care;24 (Suppl 1):S77-9, 2001.
3. American Diabetes Association. Clinical Practice Recommendations. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care;26 (Suppl 1):S5-20, 2003.
4. American Diabetes Association Position Statement : **Standards of Medical Care for Patients with Diabetes mellitus.** Diabetes Care, 22:S32-S41, 1999.
5. Brownlee M.; Cerami A.; Vlassara H.; **Advanced glycosylation end roducts and the biochemical basis of diabetic complications.** N Engl J Med;318:1315-21, 1988.
6. Bruce B. Duncan, Maria Inês Schimdt, Elsa R.J. Giuliani e col. **Medicina Ambulatorial : Condutas Clínicas em Atenção Primária**, 2 ed.- Artemed, Porto Alegre, 1996.
7. Bry, L.; Chen, P.C.; Sacks, D.B. **Effects of hemoglobin variants and chemically modified derivates on assay for glycohemoglobin.** Clin Chem., 47:153-163, 2001.

8. DCCT Research Group. Diabetes Control and Complications Trial (DCCT). **The effect of intensive treatment of Diabetes on the development and progression of the long-term complications in insulin-dependent Diabetes mellitus.** N Engl J Med., 329:977-986, 1993.
9. Eckfeldt, J.H.; Bruns, D.E. **Another step towards standardization of methods for measuring hemoglobin A1c.** Clin Chem.; 43:1811-1813, 1997.
10. Follow-up Report on the Diagnosis of Diabetes Mellitus. **The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care; 26:3160-3167, 2003.
11. Halwachs-Baumann. Gabriele; Katzensteiner, Susanne; Schnedl, Wolfgang; Pustner, Peter; PIEBER, Thomas e Wilders-Truschnig, Martie. **Comparative evaluation of three assay systems for automated determination of hemoglobin A1c.** Clin Chem.;43:511-7, 1997.
12. Khuu, H.M.; Robinson, C.A ; Goolsby, k.; Hardy, R.W.; Konrad, R.J. **Evaluation of a fully automated high-performance liquid chromatography assay for hemoglobina A1c.** Arch Pathol Lab Med., 123:763-767, 1999.
13. Kobold, Uwe; Jeppsson, Jean-Olof; Dulffer, Thomas; Finke, Andreas; Hoelzer, Wieland e Miedema, Kor. **Candidate reference methods for hemoglobin A1c based on peptide mapping.** Clin Chem.;43:1944-51, 1997.
14. Lapolla A; Fedele D.; Reitano R.; et al. **Enzymatic digestion and mass spectrometry in the study of advanced glycation and products/peptides.** J Am Mass Spectrom;15:496-509, 2004.
15. List of NGSP certified methods (update 7/03, listed by date certified) (on line). Disponível em <http://www.missouri.edu/~diabetes/ngsp.html> (2003 jul 25)
16. Malerbi D.,Franco L. **Multicenter study of the prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance in the urban Brazilian population aged 30-69 Yr.** Diabetes Care 1992;15:1509-16.
17. Mallia, A Krishna; Hermanson, Greg T.; Krohn, Randall I.; Fujimoto, Edwards K. e Smith, Paul K. **Preparation na use of s boronic acid affinity support for separation and quantitation of glycosylated hemoglobins.** Analytical Letters, 14: 649-661, 1981.
18. Nathan, D.M.; Meigs, J.; singer, d. e.; **The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 Diabetes Mellitus : how Sweet it is ... or is it?** The Lancet 350 suppl I: 4-9, 1997.

19. Oliveira, J. E. P. **Consenso brasileiro sobre diabetes 2002 : diagnóstico e classificação do diabetes melito e tratamento do diabetes melito do tipo 2.** Sociedade Brasileira de Diabetes. Rio de Janeiro : Diagraphic, p72, 2003.
20. Paz, G.; Bittencourt, A.; Campos, D.; Perotto, V.R. Liga Acadêmica de Diabetes, Universidade Federal do Paraná, 1999. (om line) [www.psfmonteverde.hpg.ig.com.br/di diabtes.html](http://www.psfmonteverde.hpg.ig.com.br/di_diabtes.html) (2004 jun 27))
21. Peterson, K.P.; Pavlovich, J.G.; Goldstein, D.; Little, R.; England, J.; peterson, C.M.- **What is hemoglobin A_{1c}? Na analysis of glycate hemoglobins by electropray ionization mass spectrometry.** Clin Chem. 1998, 44:1951-1958.
22. **Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus.** Diabetes Care 1997; 20:1183-1997.
23. Roberts, William.; Chiasera, Janelle M.;Ward-Cook, Kory M. **Glycohemoglobin results in sample with hemoglobin C or S trait: comparison or four test systems.** Clin.Chem.;45:906-909, 1999.
24. Sacks, D.B.; Bruns, D.E.; Goldstein, DE.; MacLaren, N.K.; McDonald, J.M.; Parrott, M. – **Guidelines and recomendations for laboratopry analysis in the diagnois and management of Diabetes mellitus.** Clin Chem., 48:436-472, 2002.
25. Sacks, D.B. – Carbohydrate. In : Burtis, C.A; Ashwood, E. R., ed, **Tietz textbook of clinical chemistry.** Philadelphia, W.B. Saunders Company, p.750-808, 1999.
26. Sacks, D.B.; **Hemoglobin variants and hemoglobin A1c analysis : Preoblem solved?** Clin.Chem.;49:1245-1247, 2003.
27. Sing .; Barden A. Mori T.; Beilin L.; **Advanced glycation end products : a review.** Diabrtologia 44:129-46, 2001.
28. Turpeinen, Ursula; Karjalainen, Ulla e Stenman, Ulf-Håkan. **Three assays for glycohemoglobin compared.** Clin.Chem.;41:191-195, 1995.
29. UK Prospective Diabetes Study Group : intensive blood glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in the patients with type 2 Diabetes. Lancet. 1998, 352:837-853.

30. Weykamp, C.W.; Penders, T.J.; Muskiet, F.AJ., Van der Slik, W. Effect of calibration on dispersion of glycohemoglobin values as determined by 111 laboratories using 21 methods. Clin Chem. 1994, 40:138-44.

31. Weykamp, Cas W.; Miedema, Kor; Haan, Tjeerd; Doelman, Cees J.A Carbamylated hemoglobin interference in glycohemoglobin assays. Cli.Chem.;45:438-440, 1999.