

## HEMOGLOBINA GLICOSILADA — ESTRUTURA, IMPORTÂNCIA CLÍNICA, E MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO

*M. Carlota Proença e J. Martins e Silva*Cadeira de Bioquímica. Faculdade de Medicina de Lisboa.  
Lisboa. Portugal.1. *Estrutura e características da hemoglobina glicosilada*

Cerca de 90% da hemoglobina (Hb) dos adultos e crianças normais (com idades superiores a 6 meses) é constituída pela HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ); a par deste componente principal, existem habitualmente duas outras fracções, a HbA<sub>2</sub> ( $\alpha_2\delta_2$ ), perfazendo cerca de 2,5% da Hb total e a HbF ( $\alpha_2\gamma_2$ ), apenas 0,2% a 0,5%. A síntese de cada uma das cadeias polipeptídicas ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ) daqueles três componentes da hemoglobina é codificada por genes diferentes.<sup>1</sup>

Em 1958, Allen, Schroeder e Balog<sup>2</sup> descobriram, por cromatografia com resinas permutadoras de iões, três outras fracções menores da hemoglobina. Estas fracções, que se verificou serem glicosiladas e apresentarem a mesma constituição polipeptídica da HbA, foram designadas por ordem de eluição como HbA<sub>1a</sub>, HbA<sub>1b</sub>, HbA<sub>1c</sub>. A diferença de estrutura entre a HbA e as fracções glicosiladas residiria na presença de um grupo químico não identificado, fixado à extremidade NH<sub>2</sub> do aminoácido (valina) terminal das cadeias  $\beta$ .<sup>3</sup> Na sequência, ficou estabelecido que cada molécula de HbA<sub>1c</sub> possuía dois daqueles grupos que, sendo inicialmente caracterizados como hexoses,<sup>4</sup> vieram a ser identificados como moléculas de glicose.<sup>5</sup>

A natureza exacta da HbA<sub>1a</sub> e HbA<sub>1b</sub> está ainda por esclarecer. McDonald e Cols<sup>6</sup> separaram da HbA<sub>1a</sub> dois componentes, a HbA<sub>1a1</sub> e a HbA<sub>1a2</sub>, também glicosilados na extremidade NH<sub>2</sub> das cadeias  $\beta$ , respectivamente, pela frutose 1,6-difosfato e glicose-6-fosfato. A estrutura da HbA<sub>1b</sub> permanece desconhecida; pensa-se que seja igualmente glicosilada mas não ao nível da extremidade NH<sub>2</sub> das cadeias  $\beta$ ; provavelmente, apenas uma das cadeias  $\beta$  seria modificada, talvez por desaminação de uma molécula de asparagina ou de glutamina.<sup>7</sup> Admite-se ainda a existência de outras fracções menores, HbA<sub>1d</sub> e HbA<sub>1e</sub>.

Ao contrário das hemoglobinas A, A<sub>2</sub> e F, as fracções glicosiladas seriam formadas no decurso dos 120 dias de vida eritrocitária, por um processo lento e certamente não-enzimático.<sup>8</sup>

2. *Importância em diabetologia*

A totalidade dos componentes glicosilados da HbA é expressa como HbA<sub>1</sub>. No indivíduo normal, a HbA<sub>1</sub> perfaz cerca de 6 a 10% da hemoglobina total eritrocitária, dos quais 4 a 6% são representados pela HbA<sub>1c</sub>.<sup>9</sup> Nos diabéticos, aqueles valores elevam-se respectivamente, para cerca de 18% e 13%, ou mais.<sup>9, 10</sup>

O interesse pela  $HbA_{1c}$ , e, particularmente pela fracção mais abundante (a  $HbA_{1c}$ ), foi suscitado pelas observações de Huisman e Dozy,<sup>11</sup> mais tarde confirmadas por outros grupos.<sup>12, 13</sup>

Nesses trabalhos verificou-se aumento da  $HbA_{1c}$  na diabetes mellitus, sobretudo marcado em períodos de descompensação metabólica.<sup>11, 13</sup> Desde então, numerosos trabalhos têm vindo a confirmar aquelas observações iniciais, de modo a que a determinação da  $HbA_{1c}$  ou, mais especificamente, a da  $HbA_{1c}$  é, como alternativa à da glicémia ou glicosúria, tida como um processo excelente de avaliação do equilíbrio metabólico na diabetes humana.<sup>9, 10, 14</sup>

Não há qualquer inconveniente em medir o conjunto das fracções glicosiladas ( $HbA_1$ ) em vez da  $HbA_{1c}$ , já que existe boa correlação entre os valores de ambos os parâmetros.<sup>15</sup> É de prever, todavia, que, no futuro, será a  $HbA_{1c}$  e não a  $HbA_1$  a constituir o elemento comum de referência neste tipo de estudo diabetológico. Para tal, torna-se necessário dispor de técnicas exactas e rápidas que possibilitem o processamento de número elevado de amostras em exames de rotina clínica. Este ponto tem constituído um dos principais obstáculos em estudos sistemáticos, não só para apreciação do controlo metabólico e eficácia do tratamento mas ainda, eventualmente, para o rastreio da diabetes ou avaliação das interrelações entre o grau de controlo metabólico e a ocorrência das complicações que se lhe associam.

### 3. Métodos de doseamento

Ainda não existe um método quantitativo que preencha satisfatoriamente os requisitos de rapidez e exactidão pretendidos em observações de rotina clínica. Esta dificuldade tem motivado os esforços de diversos grupos de trabalho, com reflexo em quatro tipos de técnicas descritas: cromatográficas, electroforéticas, colorimétricas e, muito recentemente, as radioimunológicas.

#### 3.1. Métodos cromatográficos

Os métodos cromatográficos em uso baseiam-se nas técnicas originais de Schroeder e Cols<sup>2, 16</sup> com resinas permutadoras de catiões (Amberlite ICR 50): as fracções glicosiladas eram separadas a 4° C, em conjunto com a HbF, dos restantes componentes da hemoglobina, eluídos a 28° C. Dessas técnicas, em que cerca de 80 h eram consumidas na separação dos componentes glicosilados e mais 4 dias para a regeneração das colunas, derivaram: a simplificação directa da técnica de Allen e Cols,<sup>2</sup> os métodos automáticos e os *Kits* comerciais.

A modificação do método de Allen e Cols<sup>2</sup> por Trivelli e Cols<sup>13</sup> encurtou a duração das análises para 9 horas, período este que continuava a ser excessivo para determinações de rotina em grande número de amostras. Todavia, já era possível separar a  $HbA_{1c}$  das restantes fracções glicosiladas à temperatura ambiente, recorrendo a dois tipos de tampões e a uma diferente resina permutadora de catiões (Bio Rex 70).

Com um sistema de dois tampões e suporte estacionário equivalente, foram subsequentemente introduzidas modificações, sobretudo nas dimensões das colunas, características das partículas do meio e instrumentação. Assim, recorrendo a colunas mais curtas e estreitas e a volumes reduzidos de hemolisado, foi possível encurtar o tempo total de eluição para 2,5 horas<sup>17, 18</sup> ou 20 minutos.<sup>19</sup> Exceptuando um destes métodos,<sup>19</sup> nos restantes a quantificação da  $HbA_{1c}$  é substituída pela determinação das três fracções rápidas ( $HbA_{1a+1b+1c}$ ) no mesmo eluado, como  $HbA_1$ .

Além da diminuição de resolução, potencialmente influente na interpretação dos resultados, a avaliação global das fracções glicosiladas como HbA<sub>1</sub> apresenta outra desvantagem, inerente à ligeira contaminação da HbA<sub>1</sub> com a HbA. Este inconveniente, embora pouco significativo, explica que a produção de HbA<sub>1</sub> seja superior ao somatório da HbA<sub>1a+1b+1c</sub>.

Tendo como fundamento o método de Kynoch e Cols,<sup>17</sup> diversas companhias de produtos laboratoriais vêm desenvolvendo sistemas de reagentes e colunas pré-preparados de utilização única, em exames de rotina. Esses sistemas (*Kits*), comercializados sobretudo por Isolab Inc., Biorad, Helena Laboratories e Brinkman, utilizam a Bio Rex 70 em mini-colunas, para separar, no mesmo eluado, as principais fracções da hemoglobina glicosilada como HbA<sub>1</sub>. A eluição é rápida e permite a determinação simultânea de um número considerável de amostras. Particularmente dois desses métodos (Helena e Isolab) evidenciam grande dependência da temperatura ambiente, requerendo rigoroso controlo térmico; na generalidade, também as minicolunas são muito sensíveis a variação de pH e força iónica dos tampões<sup>20, 21</sup> além de, tal como sucede com as macrocolunas,<sup>13</sup> não possibilitarem um controlo permanente da qualidade de separação das diversas fracções.<sup>20</sup>

Os métodos de cromatografia automática permitiriam ultrapassar alguns daqueles problemas. A par do controlo das características de separação, por registo contínuo das fracções eluídas, foram ainda substancialmente aumentadas as possibilidades de determinação de dezenas de amostras, com rapidez e precisão. Os métodos são desenvolvidos a baixa ou alta pressão, utilizando um sistema de três tampões de gradiente variável e volume reduzido de amostra (microlitros), para separar as diversas fracções glicosiladas, sobretudo a HbA<sub>1c</sub>. Têm o inconveniente de ser demasiado complicados e dispendiosos para exames de rotina, estando ainda fora do alcance da maioria dos laboratórios.

Finalmente, em todos os métodos cromatográficos descritos até hoje, as fracções glicosiladas são contaminadas com a HbF, produtos de desnaturação da Hb e algumas variantes da Hb normal.<sup>24</sup>

### 3.2. Métodos electroforéticos

Este tipo de método, que aplica o princípio da focagem das proteínas no seu ponto isoeléctrico num gradiente de pH, é utilizado para a hemoglobina desde 1971.<sup>25</sup> A separação das hemoglobinas com a isofocagem em gel de poliacrilamida é superior à das electroforeses, além de permitir a observação simultânea de grande número de amostras. As fracções menores da HbA, com pH inferior ao da HbA, migram em fracções distintas; todavia, com os anfólitos disponíveis, não é possível separar claramente a HbA<sub>1c</sub> da HbA.<sup>26</sup> Não obstante a densitometria das placas ter melhorado a separação da HbA<sub>1c</sub>, relativamente à HbA e à HbF,<sup>26, 27</sup> esta técnica, embora prometedora, não está ainda a ser aplicada na generalidade dos laboratórios, talvez devido a dificuldades de apetrechamento.

### 3.3. Métodos colorimétricos

Submetendo soluções contendo hemoglobina glicosilada a hidrólise ácida a 100° C, obtém-se a libertação do 5-hidroxiacetilfurfural; esta reacção seria consistente com a existência de uma ligação cetó-amina nos pontos de glicosilação.<sup>29</sup> O 5-hidroxiacetilfurfural pode ser quantificado espectrofotometricamente após reagir com o ácido tiobar-

bitúrico, de que se forma um composto corado com pico de absorção típico, a 443 nm. Esta técnica, aparentemente fácil, exhibe contudo algumas desvantagens; requer grande precisão metodológica e não evita que concentrações elevadas de monossacáridos no plasma interfiram nos resultados. A baixa reprodutibilidade e fraca correlação com a HbA<sub>1c</sub> retira eficácia a este método, apesar de satisfazer, em princípio, os requisitos de simplicidade e rapidez. As alterações recentemente introduzidas<sup>30</sup> não evitam que os passos metodológicos sejam dependentes de grande precisão; por outro lado, o processo não é estequiométrico. A principal vantagem técnica, relativamente à cromatografia em colunas, é a de possibilitar a determinação da Hb glicosilada na presença de variantes da HbA, HbF e HbS.

#### 3.4. Métodos radioimunológicos

Este tipo de técnica, bastante sensível e requerendo quantidades mínimas de amostra (100 µl) encontra-se nos seus primeiros passos. Possibilita a identificação da HbA<sub>1c</sub>, mas apresenta reacções cruzadas com a HbA<sub>1c</sub> e Hb<sub>1b</sub>.<sup>31</sup> Todavia, por necessitar de anticorpos de elevada qualidade e padrões de hemoglobina bem caracterizados, uns e outros ainda não conseguidos, não pode, por enquanto, ser aplicado a estudos de rotina.

#### BIBLIOGRAFIA

1. GAJDOS A: *Médecine et Biochimie*, Masson et Cie, Ed., Paris, 1967.
2. ALLEN DW, SCHROEDER WA e BALOG J: Observations on the chromatographic heterogeneity of normal adult and fetal human hemoglobin. *J Amer Chem*, 1958; 80: 1628-1634.
3. HOLMQUIST WR e SCHROEDER WA: A new N—terminal blocking group involving a Schiff base in hemoglobin. *Biochemistry*, 1966; 6: 2489-2503.
4. BOOKCHIM R e GALLOP P: Structure of hemoglobin A<sub>1c</sub>. Nature of the N—terminal β-chain blocking group. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968; 52: 89-93.
5. BUNN HF, HANNEY D, GABBAY K e GALLOP P: Further identification of the nature and linkage of the carbohydrate in hemoglobin A<sub>1c</sub>. *Biochem Biophys Res Commun*, 1975; 67: 103-109.
6. McDONALD M, SHAPIRO R, BLEICHMAN M, SOLWAY J e BUNN HF: Glycosylated minor components of human adult hemoglobin. *J Biol Chem* 1978; 253: 2327-2332.
7. KRISHNAMORTHY R, GACON G e LABIE D: Isolation and partial characterization of hemoglobin A<sub>1b</sub>. *Febs Letters* 1977; 77: 99-102.
8. BUNN H, HANNEY D, KALMIN S, GABBAY L e GALLOP P: Biosynthesis of human hemoglobin A<sub>1c</sub>. *J Clin Invest*, 1976; 57: 1652-1659.
9. GONEN B e RUBENSTEIN AH: Haemoglobin A<sub>1</sub> and diabetes mellitus. *Diabetologia*, 1978; 15: 1-8.
10. BUNN HF: Nonenzymatic glycosylation of proteins: relevance to diabetes. *Amer J Med*, 1981; 70: 325-330.
11. HUISMAN TH e DOZY AM: Studies on the heterogeneity of hemoglobin. V. Binding of hemoglobin with oxidized glutathione. *J Lab Clin Med*, 1962; 60: 302-319.
12. RAHBAR S, BLUMENFELD O e RANNEY HM: Studies of the unusual hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969; 36: 838-845.
13. TRIVELLI LA, RANNEY HM e LAI HT: Hemoglobin components in patients with diabetes mellitus. *N Engl J Med*, 1971; 284: 353-357.
14. CLARKE J, PASSA P e CANIVET J: Hemoglobin A<sub>1c</sub>: intérêt de son dosage chez les diabétiques. *Nouv Presse Med*, 1979; 8: 513-517.
15. GABBAY L, HASTY K, BRESLOW J, ELLISON C, BUNN HF e GALLOP P: Glycosylated hemoglobin and long-term blood glucose control in diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab*, 1977; 44: 859-864.
16. SCHNECK A e SCHROEDER N: The relationship between the minor components of whole normal adult hemoglobin as isolated by chromatography and starch block electrophoresis. *J Amer Chem Soc*, 1961; 83: 1472-1478.

17. KYNOCH PAM e LEHMANN H: Rapid estimation (2 1/2 hours) of glycosylated haemoglobin for routine purposes. *Lancet*, 1977; 2: 16.
18. JONES MB, KOLER RD e JONES RT: Micro-column method for the determination of hemoglobin minor fractions  $A_{1a+b}$  and  $A_{1c}$ . *Hemoglobin*, 1978; 2: 53-58.
19. WELCH SG e BOUCHER BJ: A rapid micro-scale method of the measurement of haemoglobin  $A_T$  (a+b+c). *Diabetologia*, 1978; 14: 209-211.
20. DAVIS JE, McDONALD JM e JARRETT L: A high-performance liquid chromatography method for hemoglobin  $A_{1c}$ . *Diabetes*, 1978; 27: 102-107.
21. SCHELLEKENS APM, SANDERS GTB, THORNTON W e VAN GROENESTEIN T: Sources of variation in the column-chromatographic determination of glycohemoglobin (HbA<sub>1c</sub>). *Clin. Chem*, 1981; 27: 94-99.
22. WAJCMAN H, DASTUGNE B e LABIE D: Quantification of hemoglobin  $A_{1c}$ : a rapid automated precision-chromatography technique. *Clin Chim Acta*, 1979; 92: 33-39.
23. DUNN PJ, COLE RA e SOEIDNER JS: Further development and automation of a high pressure liquid chromatography method for the determination of glycosylated hemoglobin. *Metabolism*, 1979; 28: 777-779.
24. GAREL MC, BLOUQUIT Y, MOLKO F e ROSA J: HbA<sub>1c</sub>: a review on its structure, biosynthesis, clinical significance and methods of assay. *Biomedicine*, 1979; 30: 234-240.
25. DRYSDALE JW, RIGHETTI P e BUNN HF: The separation of human and animal hemoglobins by isoelectric focusing in polyacrylamide gel. *Biochim Biophys Acta*, 1971; 229: 42-50.
26. BASSET P, BEUZARD Y, GAREL MC e ROSA J: Isoelectric focusing of human hemoglobin its application to screening, to the characterization of 70 variants and to the study of modified fractions of normal hemoglobins. *Blood*, 1978; 51: 971-982.
27. SCHOOS R, SCHOOS-BARBETTI S e LAMBOTTE C: Dosage of hemoglobin  $A_{1c}$  by isoelectrofocusing. *Clin Chim Acta*, 1978; 86: 61-65.
28. SPICER KM, ALLEN RC e BUSE MG: A simplified assay of hemoglobin  $A_{1c}$  in diabetic patients by use of isoelectrofocusing and quantitative microdensitometry. *Diabetes*, 1978; 27: 384-388.
29. FLUCKIGER R e WINTERHALTER RH: In vitro synthesis of hemoglobin  $A_{1c}$ . *Febs Letters*, 1976; 71: 356-360.
30. PECORARO RE, GRAF RJ, HALTER JB, BEITER H e PORTE DJr: Comparison of a colorimetric assay for glycosylated hemoglobin with ion-exchange chromatography. *Diabetes*, 1979; 28: 1120-1125.
31. JAVID J, PETTIS PR, KOENIG RP e CERAMI A: Immunologic characterization and quantification of haemoglobin  $A_{1c}$ . *Brit J Haematol*, 1978; 38: 329-337.

Pedido de Separatas: M. Carlota Proença  
Cadeira de Bioquímica  
Faculdade de Medicina de Lisboa  
1600 Lisboa. Portugal.