

# Pico alto da hemoglobina carbamilada discordante com o nível de ureia: relato de caso

## *High peak of carbamylated hemoglobin discordant with urea level: a case report*

Siti N. Ab-Rahim<sup>1</sup>; Tuan S. Tuan-Ismail<sup>2</sup>; Hanim A. Ibrahim<sup>3</sup>; Mohd N. Hassan<sup>4</sup>

1. National Defence Universiti of Malaysia, Kem Perdana Sungai Besi, Kuala Lumpur, Malásia. 2. School of Medical Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, Malásia. 3. School of Dental Sciences, Universiti Sains Malaysia, Kota Bharu, Kelantan, Malásia. 4. Hospital Universiti Sains Malaysia, Kubang Kerian, Kelantan, Malásia.

### RESUMO

A dosagem de hemoglobina A1c (HbA1c) é comumente realizada em pacientes com diabetes *mellitus* para monitorar o controle glicêmico nos últimos três a quatro meses. A hemoglobina carbamilada – hemoglobina que se liga ao ácido isocianico derivado da ureia – é uma das possíveis interferências analíticas no paciente urêmico. Quando medida por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) por troca iônica, a hemoglobina carbamilada forma um pico que se sobrepõe ao pico da HbA1c, causando um resultado falsamente elevado da HbA1c. Relatamos o caso de um homem de 60 anos de idade que apresentava um aumento espúrio de HbA1c, com alto pico de hemoglobina carbamilada desproporcional ao valor de ureia. A análise subsequente da hemoglobina usando eletroforese de hemoglobina e sistema de teste de hemoglobina por HPLC sugeriu a variante de hemoglobina J (Hb J). Nosso caso destacou a possibilidade de interpretação enganosa da HbA1c na presença de um pico alto de hemoglobina carbamilada, mas não proporcional ao valor da ureia. Neste estudo, foi detectada a Hb J. Um método isento de interferência de variantes da hemoglobina deve ser idealmente usado, e o monitoramento do controle glicêmico deve ser feito usando métodos alternativos, como frutossamina sérica ou monitoramento contínuo da glicose.

**Unitermos:** hemoglobina A glicada; cromatografia líquida de alta pressão; hemoglobina carbamilada; ureia.

### ABSTRACT

*Hemoglobin A1c (HbA1c) measurement is commonly performed in diabetes mellitus patients to monitor glycemic control over the last three to four months. Carbamylated hemoglobin, which is the hemoglobin that binds to isocyanic acid derived from urea, is one of the possible analytical interference in the uremic patient. When measured by ion-exchange high-performance liquid chromatography (HPLC), carbamylated hemoglobin forms a peak that overlaps the peak of HbA1c, causing a falsely elevated HbA1c result. We report a case of a 60-years-old man who had a spurious increase in HbA1c, with a high carbamylated hemoglobin peak disproportionate to the urea value. Subsequent hemoglobin analysis using hemoglobin electrophoresis and HPLC hemoglobin testing system suggested hemoglobin J (Hb J) variant. Our case highlighted the possibility of misleading HbA1c interpretation in the presence of a high carbamylated hemoglobin peak, but not proportionate to urea value. In this study, Hb J was detected. A method free from hemoglobin variant interference should be used ideally, and monitoring glycemic control should be performed using alternative methods, such as serum fructosamine or continuous glucose monitoring.*

**Key words:** glycosylated hemoglobin A; chromatography high-pressure liquid; carbamylated hemoglobin; urea.

## RESUMEN

*La prueba de la hemoglobina glicosilada A1c (HbA1c) se realiza comúnmente en pacientes con diabetes mellitus para monitorear el control glucémico durante los últimos tres o cuatro meses. La hemoglobina carbamilada, que es la hemoglobina que se une al ácido isocianico derivado de la urea, es una de las posibles interferencias analíticas en el paciente urémico. Cuando se mide mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de intercambio iónico, la hemoglobina carbamilada forma un pico que se superpone al pico de HbA1c, lo que provoca un resultado de HbA1c falsamente elevado. Presentamos el caso de un hombre de 60 años que tuvo un aumento espurio de HbA1c, con un pico de hemoglobina carbamilada alto desproporcionado al valor de urea. El análisis de hemoglobina posterior mediante electroforesis de hemoglobina y el sistema de prueba de hemoglobina HPLC sugirió una variante de hemoglobina J (Hb J). Nuestro caso destacó la posibilidad de una interpretación engañosa de la HbA1c en presencia de un pico de hemoglobina carbamilada alto, pero no proporcional al valor de urea. En este estudio, se detectó Hb J. Lo ideal sería utilizar un método libre de interferencia de variantes de hemoglobina, y la monitorización del control glucémico debería realizarse mediante métodos alternativos, como la fructosamina sérica o la monitorización continua de la glucosa.*

**Palabras clave:** hemoglobina A glicada; cromatografía líquida de alta eficacia; hemoglobina carbamilada; urea.

## INTRODUÇÃO

HbA1c é uma molécula de hemoglobina irreversivelmente glicada em uma ou ambas terminações valina N-terminal das cadeias beta<sup>(1)</sup>. Ela fornece uma estimativa para o controle da glicose do paciente diabético nos últimos três a quatro meses, refletindo a expectativa de vida dos eritrócitos de 120 dias<sup>(1)</sup>. Usando cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de troca catiônica, a HbA1c é separada de outras frações da hemoglobina em uma coluna devido à diferença de carga<sup>(2)</sup>. Este método, contudo, está sujeito a interferências analíticas de muitos fatores, como a presença de hemoglobina quimicamente modificada, como a hemoglobina carbamilada<sup>(1)</sup>. O processo de carbamilação ocorre quando o isocianato derivado da ureia impede a glicação da molécula de hemoglobina em sua porção valina N-terminal<sup>(3)</sup>. Ureia acima do nível de 30 mmol/l ou mais foi descrita como causa de interferência na HPLC<sup>(4)</sup>.

Apresentamos um caso de valor de HbA1c persistentemente alto, secundário ao alto pico de hemoglobina carbamilada, com nível de ureia variando apenas de 5,7 mmol/l até, no máximo, 15,2 mmol/l, em um período de quatro anos. A análise posterior da hemoglobina revelou a presença de variante da hemoglobina J (Hb J).

## RELATO DE CASO

Homem de 60 anos de idade com doença cardíaca isquêmica subjacente, hipertensão e diabetes *mellitus* tipo 2 compareceu ao pronto-socorro com história de uma semana de palpitação intermitente associada à perda de apetite. Ao exame físico,

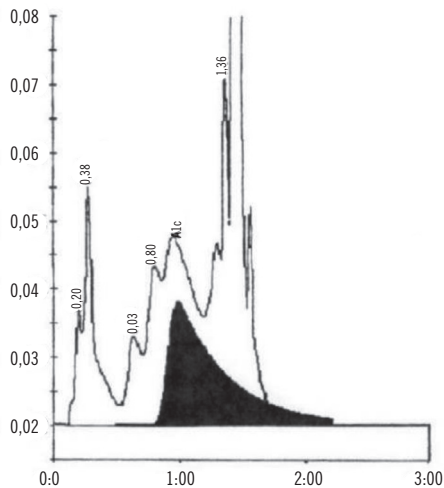
encontrava-se letárgico, desidratado e hipotenso (pressão arterial de 83 × 50 mmHg), com frequência cardíaca inicial de 53/minuto. O paciente queixou-se de palpitação de início súbito, durante a qual notamos que a frequência cardíaca variou entre 140 e 160/minuto. O eletrocardiograma (ECG) mostrou fibrilação atrial, o que exigiu infusão de amiodarona intravenosa e repetição subsequente do ECG. O exame revelou alterações compatíveis com infarto do miocárdio, sem supradesnivelamento de ST. O paciente foi internado e recebeu tratamento para infarto agudo do miocárdio com apresentação atípica. Também foi tratado para sepse (leucocitose, proteína C reativa positiva e hemocultura positiva) associada à lesão renal aguda, com ureia de 15,2 mmol/l e creatinina de 223 µmol/l. Devido ao seu histórico de diabetes, a glicemia capilar à beira do leito durante a doença aguda foi monitorada e variou de 13,4 mmol/l a 21 mmol/l, necessitando de Actrapid subcutâneo regular. O nível de glicose plasmática foi de 31,4 mmol/l, e a HbA1c medida com o programa HPLC Bio-Rad D-10 HbA1c foi considerada muito alta (21,9%), fora do limite relatável. O cromatograma HPLC mostrou um pico muito alto de hemoglobina carbamilada (12,6%) (**Figura 1**), o que nos alertou para a possibilidade de interferência positiva na medição de HbA1c.

Depois que a doença foi controlada e a insulina foi suspensa, a glicemia capilar normalizou e o paciente recebeu alta com glicemia plasmática de 6,5 mmol/l. A função renal também voltou ao normal, com ureia de 2,3 mmol/l e creatinina de 97 µmol/l.

Supostamente, esse paciente foi previamente diagnosticado com diabetes *mellitus* tipo 2 em 2015, durante a admissão na enfermaria por sepse com base em uma glicemia em jejum de 14,4 mmol/l e HbA1c muito alta, fora da faixa relatável. Desde então, iniciou tratamento com hipoglicemiante oral (T. Gliclazide

FIGURA 1 – Cromatograma HPLC (Bio-Rad D10) para análise de HbA1c com alto pico de Hb carbamylada coeluída com HbA1c (pico de HbA1c destacado em preto)

Nome do pico	Tempo de retenção	Altura	Área	Área (%)
A1a	0,2	16526	58905	1,9
A1b	0,28	34839	202876	6,6
LA1c/CHb-1	0,63	13038	95742	3,1
LA1c/CHb-2	0,8	22825	375871	12,1
A1c	0,99	18096	555061	21,9
P3	1,36	51313	351875	11,4
Ao	1,43	420664	1453518	47

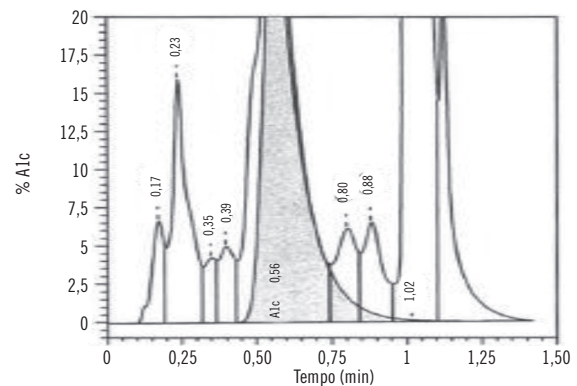


HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; HbA1c: hemoglobina glicada A1c.

MR 30 mg por dia), e a HbA1c foi regularmente medida para monitorar o controle glicêmico. Curiosamente, a partir de registros anteriores, verificamos que a HbA1c sempre foi muito alta e não relatada; o cromatograma mostrou um pico de hemoglobina carbamylada persistentemente alto, mesmo com ureia sanguínea não muito alta, variando apenas de 2,1 mmol/l até o máximo de 5,7 mmol/l. A glicose no sangue, nos últimos quatro anos (2015 a 2018), também estava bem controlada, variando de 6,9 mmol/l até o máximo de 10 mmol/l, e o uso de agente hipoglicemiante oral foi descontinuado após a recente admissão. Por esse motivo, a mesma amostra foi enviada para análise usando outro HPLC (Bio-Rad V-II Turbo). A HbA1c ainda foi detectada como muito alta (27,1%), fora da faixa relatável, mas, dessa vez, nenhum pico de hemoglobina carbamylada foi observado, o que sugeriu a possibilidade de uma variante da hemoglobina (Figura 2). A amostra foi então enviada para análise de hemoglobina utilizando HPLC (Bio-Rad Variant II, Beta Thalassaemia Short Programme, EUA) e eletroforese de hemoglobina em gel de agarose (Interlab G26, Itália) e revelou a presença de uma variante de hemoglobina anormal, provavelmente Hb J (Figura 3). Porém, o estudo molecular para a confirmação não foi enviado devido a um problema logístico.

FIGURA 2 – Cromatograma HPLC (variante 2 turbo) para análise de Hb A1c mostra nível muito alto de HbA1c

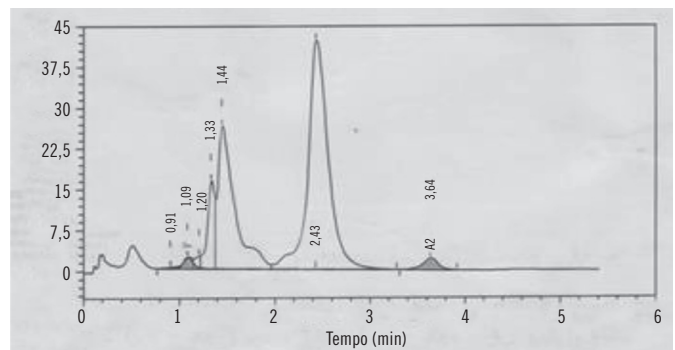
Nome do pico	Área calibrada (%)	Área	Tempo de retenção (min)	Área do pico
A1a	---	2,1	0,169	59436
A1b	---	6,8	0,233	189205
Desconhecido	---	1,3	0,346	35308
Desconhecido	---	2	0,394	55695
A1c	27,1	---	0,561	700548
P3	---	3,3	0,800	92468
P4	---	3,3	0,880	91501
Ao	---	55,8	1,016	1543847



HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; HbA1c: hemoglobina glicada A1c.

FIGURA 3 – HPLC (variante II, Beta-Talassemia Short Program) revelou um pico P3 aumentado (29,2%) com baixo HbA (58,1%) e HbA2 e HbF normais (2,1% e 1%, respectivamente). Uma análise posterior com eletroforese em gel de agarose alcalina (Interlab G26) revelou uma banda anormal anódica à banda A. Esses achados são sugestivos de uma variante da hemoglobina, provavelmente Hb J

Nome do pico	Área calibrada (%)	Área (%)	Tempo de retenção (min)	Área do pico
P1	---	0,1	0,91	2711
F	1,3	---	1,09	34790
Desconhecido	---	0,8	1,2	21745
P2	---	8,3	1,33	213733
P3	---	29,2	1,44	754041
Ao	---	58,1	2,43	1501669
A2	2,1	---	3,64	57129



HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência; HbA: hemoglobina A; HbA2: hemoglobina A2; HbF: hemoglobina F; Hb J: hemoglobina variante J.

## DISCUSSÃO

---

A hemoglobina carbamilada é a hemoglobina condensada com ácido isociânico na porção valina N-terminal de sua molécula, a forma reativa do cianato derivado da decomposição espontânea da ureia<sup>(3)</sup>. A alteração na porção valina N-terminal para as moléculas de HbA1c e de hemoglobina carbamilada faz com que elas se tornem menos positivas, portanto, menos atraídas pelas resinas carregadas negativamente na coluna de separação; assim, migram mais rápido do que a hemoglobina A (HbA)<sup>(5)</sup>. A hemoglobina carbamilada pode representar uma possível interferência na HPLC durante a medição de HbA1c porque a modificação química nos resultados da valina N-terminal em ambas as moléculas coeluem quase ao mesmo tempo, subsequentemente produzindo um pico de cromatograma sobreposto<sup>(6)</sup>.

Vos FE *et al.* (2011)<sup>(4)</sup> relatam que a hemoglobina carbamilada causa interferência significativa na medição de HbA1c por HPLC quando a ureia é igual ou superior a 30 mmol/l. No entanto, o nível de ureia do nosso paciente nunca foi muito alto, mas a hemoglobina carbamilada persistiu, causando um valor de HbA1c consistentemente muito alto, fora da faixa relatável. Além disso, o valor de HbA1c sempre foi superior a 15%, não correspondendo ao seu nível de glicose no sangue. Isso levanta a suspeita de uma variante da hemoglobina não separável da fração HbA1c<sup>(7)</sup>. Ao contrário da A1c lábil, que também pode causar interferência semelhante, nem a hemoglobina carbamilada nem a variante de hemoglobina podem ser resolvidas utilizando incubação devido à modificação permanente<sup>(6)</sup>.

Ademais, a análise repetida usando uma HPLC diferente não mostrou qualquer presença de pico de hemoglobina carbamilada, apesar do alto valor de HbA1c de mais de 15%. O paciente também não apresentava outros fatores de risco que pudessem levar a uma HbA1c falsamente alta, como nos casos em que a vida útil dos eritrócitos é prolongada, reduzindo a renovação dos glóbulos vermelhos (por exemplo, anemia por deficiência de ferro) ou transfusão de sangue recente<sup>(1)</sup>. Por esse motivo, a análise de hemoglobina foi realizada e relatada como consistente com a variante Hb J. O mecanismo de interferência das variantes da hemoglobina pode variar; portanto, um tipo diferente de variante pode causar uma HbA1c falsamente alta ou baixa (Figura 1C)<sup>(4, 5)</sup>. Contudo, foi relatado que a variante da Hb J está causando um valor de HbA1c anormalmente alto e

desproporcional à glicose plasmática<sup>(8)</sup>. Em tais casos, deve ser escolhida uma metodologia alternativa, como o imunoensaio que usa anticorpo específico para HbA1c ou a eletroforese capilar, que pode diferenciar HbA1c de uma hemoglobina variante<sup>(2, 9)</sup>. No entanto, em nosso centro, esses métodos não estão disponíveis.

Outra opção é a frutossamina sérica, uma glicoproteína que fornece informações de controle glicêmico em um período de duas a quatro semanas e não é afetada pelas características dos eritrócitos e da hemoglobina. A leitura de HbA1c anormalmente alta como essa não deve ser menosprezada, pois uma interpretação enganosa pode levar à superestimativa do controle glicêmico e a um diagnóstico incorreto. Na presença de pico carbamilado alto ou variantes de hemoglobina, deve-se considerar a alternativa às medições de HbA1c, como frutossamina sérica que mede albumina glicada, ou monitoramento contínuo de glicose<sup>(1, 10)</sup>. Porém, ao contrário da HbA1c, nenhuma outra medida alternativa foi observada como superior à HbA1c na previsão de complicações relacionadas com o diabetes *mellitus*<sup>(1, 10)</sup>. Portanto, seu uso deve ser limitado apenas nos casos em que os resultados de HbA1c podem ser mal interpretados<sup>(1)</sup>.

## CONCLUSÃO

---

A interpretação da HbA1c deve levar em consideração tanto seu aspecto clínico quanto analítico, especialmente quando são observados o valor de HbA1c discordante e sua glicose plasmática. Ao relatar HbA1c, um pico suspeito e um valor de HbA1c muito alto ou baixo que esteja fora da faixa relatável deve alertar a possibilidade de uma variante de hemoglobina. Portanto, idealmente, outras investigações podem incluir a medição de HbA1c com um método de ensaio diferente e a análise de hemoglobina para determinar o tipo de variante. Enquanto isso, o monitoramento do controle glicêmico deve ser feito por meio de outras modalidades, como frutossamina sérica ou monitoramento contínuo da glicose.

## AGRADECIMENTOS

---

Agradecemos a todos os funcionários da Unidade Endocrinológica da University Sains Malaysia, Laboratório de Patologia Química, Hospital da University Sains Malaysia pela valiosa ajuda.

## REFERÊNCIAS

---

1. Radin MS. Pitfalls in hemoglobin A1c measurement: when results may be misleading. *J Gen Intern Med.* 2014; 29(2): 388-94.
2. Gupta S, Jain U, Chauhan N. Laboratory diagnosis of HbA1c: a review. *J Nanomed Res.* 2017; 5: 00120.
3. Ozmen S, Akin D, Ozmen CA. A review to differentiate acute kidney injury from chronic kidney disease. *Br J Med Med Res.* 2016; 18(9): 1-7.
4. Vos FE, Schollum JB, Walker RJ. Glycated albumin is the preferred marker for assessing glycaemic control in advanced chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2011; 4(6): 368-75.
5. Florida S. A rare hemoglobin variant which interfered hemoglobin A1c result: hemoglobin South Florida [ $\beta$ 1 (NA1) Val> Met, GTG> ATG; HBB: c. 4G> A]. *Turk J Biochem.* 2014; 39(2): 226-30.
6. Desmons A, Jaisson S, Leroy N, Gillery P, Guillard E. Labile glycated hemoglobin and carbamylated hemoglobin are still critical points for HbA(1c) measurement. *Biochimica medica.* 2017; 27(2): 378-86.
7. Pradhan S, Chauhan S, Samal P. Incidental detection of a rare hemoglobin variant (hemoglobin N Seattle) leading to undetectable levels of HbA1c in a diabetic female: a case report. *Thal Rep.* 2017; 7(1).
8. Ares BJ, Bernardo GA, Martin-Nieto A, Gonzalez-Martinez S. Effect of hemoglobin J variant on HbA1c values as measured by HPLC (high-performance liquid chromatography). 20<sup>o</sup> European Congress of Endocrinology. 2018. BioScientifica.
9. Warade J. Comparison of glycated hemoglobin with HPLC and capillary electrophoresis. *J Res Med Sci.* 2017; 5(5): 1976-79.
10. Speckaert M, Van Biesen W, Delanghe J, et al. Are there better alternatives than hemoglobin A1c to estimate glycaemic control in the chronic kidney disease population? *Nephrol Dial Transplant.* 2014. 29(12): 2167-77.

## AUTOR CORRESPONDENTE

---

Tuan Salwani Tuan-Ismail  0000-0002-7739-8323  
e-mail: tusti@usm.my



This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.