

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Rogério Scolari

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚRICO SOBRE A FRUTOSAMINA E
HBA1C E IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE
ARMAZENAMENTO SOBRE A FRUTOSAMINA SÉRICA**

Santa Maria, RS
2020

Rogério Scolari

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚRICO SOBRE A FRUTOSAMINA E HBA1C E
IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A
FRUTOSAMINA SÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Coorientador: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Santa Maria, RS
2020

Scolari, Rogério

EFEITO IN VITRO DO ÁCIDO ÚRICO SOBRE A FRUTOSAMINA E
HbA1c E IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO
SOBRE A FRUTOSAMINA SÉRICA / Rogério Scolari.- 2020.
50 p.; 30 cm

Orientador: Rafael Noal Moresco
Coorientador: José Antonio Mainardi de Carvalho
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Ácido Úrico 2. Estabilidade 3. Frutosamina 4. HbA1c
5. Interferência I. Noal Moresco, Rafael II. Mainardi
de Carvalho, José Antonio III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

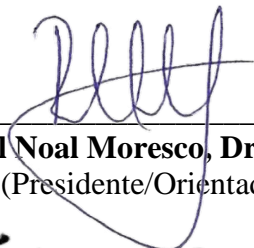
Declaro, ROGÉRIO SCOLARI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Rogério Scolari

**EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚRICO SOBRE A FRUTOSAMINA E HBA1C E
IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE
A FRUTOSAMINA SÉRICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

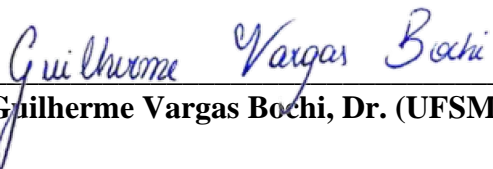
Aprovado em 4 de Setembro de 2020



Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Fabio Vasconcellos Comim, Dr. (UFMG)



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar em todos os momentos da vida e me proporcionar essa oportunidade de aprendizado e evolução como ser humano.

À minha família, meus pais Nelso e Marlene, minha irmã Daniela, meu irmão Neimar, minha cunhada Juliana e minha namorada Jucimara. Vocês são minha base de tudo! Obrigado pelo auxílio, incentivo constante e por acreditarem em mim. Se hoje chegamos até aqui, é porque esta conquista também é de vocês.

Ao meu orientador, professor Rafael, pela confiança, pelas oportunidades concedidas ao longo da minha trajetória acadêmica e profissional e pelo conhecimento compartilhado. Minha admiração não somente pelo exemplo de trabalho realizado, mas também pelo amigo que és.

Ao meu coorientador e colega José Antônio, pela contribuição, incentivo e dedicação em todas as atividades realizadas.

Ao colega José Pedro, um novo irmão que a pós-graduação me presenteou, pelo companheirismo de todas as horas e assistência no estudo.

Aos demais colegas do grupo de pesquisa LabiClin, pela amizade e ajuda concedida.

À minha banca examinadora, professores Fábio, Guilherme e Clóvis, que gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

À Universidade Federal de Santa Maria, por me oportunizar um aperfeiçoamento gratuito e de excelência.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste estudo, o meu sincero agradecimento.

Ninguém caminha sem aprender a caminhar, sem aprender a fazer o caminho caminhando,
refazendo e retocando o sonho pelo qual se pôs a caminhar.

Paulo Freire

RESUMO

EFEITO *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚRICO SOBRE A FRUTOSAMINA E HbA1c E IMPACTO DE DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO SOBRE A FRUTOSAMINA SÉRICA

AUTOR: Rogério Scolari

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

COORIENTADOR: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Os ensaios laboratoriais sofrem influência de fatores, que podem originar erros na dosagem dos analitos. Entre os principais estão a interferência de substâncias diversas, como o ácido úrico, e o armazenamento inadequado das amostras. Considerando que a hiperuricemia é um dos achados relacionados ao diabetes *mellitus*, investigar a associação entre o ácido úrico e biomarcadores como a frutossamina e a HbA1c é de grande importância, uma vez que esses ensaios são utilizados para monitorar a glicemia nesses indivíduos. Além disso, existem escassas referências sobre a interferência do ácido úrico sobre estes biomarcadores, bem como informações restritas acerca da estabilidade da frutossamina em diferentes condições de armazenamento. Logo, este estudo teve como objetivo investigar o efeito *in vitro* do ácido úrico sobre a frutossamina e a HbA1c, além de avaliar o impacto de diferentes condições de armazenamento e de consecutivos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a frutossamina. A interferência do ácido úrico foi avaliada em pools de amostras de soro ou sangue, após a adição de uma solução de ácido úrico 3,0 mmol/L (50,4 mg/dL), obtendo-se concentração final de 0,55 mmol/L (9,2 mg/dL). A frutossamina foi medida pelo método colorimétrico baseado na redução do azul de nitrotetrazólio, por meio do analisador automatizado BS 380[®] (Mindray). A HbA1c foi medida usando método cromatográfico, através do analisador D10[®] (Bio-Rad). Para investigar a estabilidade da frutossamina, as amostras de soro foram armazenadas a 4° C, -20° C e -80° C por até 28 dias, sendo analisadas nos dias 1, 7, 14, 21 e 28. Já o efeito do *stress* térmico causado pelo congelamento e descongelamento das amostras foi avaliado após o armazenamento das amostras a -20° C ou -80° C. Cada amostra foi submetida a três ciclos que ocorreram em um único dia, sendo as determinações de frutossamina realizadas após cada ciclo. A adição de ácido úrico promoveu um aumento de 8,3% na frutossamina, enquanto o HbA1c não se alterou. Além disso, o armazenamento das amostras a 4° C, -20° C e -80° C, por até 4 semanas, impactou de forma significativa na concentração de frutossamina ($P < 0,001$). Alterações significativas sobre os níveis de frutossamina, também foram observados após os sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento das amostras a -20° C e -80° C ($P < 0,01$). Desse modo, elevadas concentrações de ácido úrico provocaram um aumento nas concentrações de frutossamina, o que não foi observado na HbA1c. Ademais, o armazenamento do soro em diferentes temperaturas e condições alterou significativamente as concentrações de frutossamina.

Palavras-chave: Ácido Úrico. Estabilidade. Frutossamina. HbA1c. Interferência.

ABSTRACT

IN VITRO EFFECT OF URIC ACID ON FRUCTOSAMINE AND HbA1c AND IMPACT OF DIFFERENT STORAGE CONDITIONS ON SERUM FRUCTOSAMINE

AUTHOR: Rogério Scolari

ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

CO-ADVISOR: Dr. José Antonio Mainardi de Carvalho

Laboratory tests are influenced by factors, which can cause errors in the analyte dosage. Among the main ones are the interference of several substances, such as uric acid, and the inadequate storage of the samples. Considering that hyperuricemia is one of the findings related to diabetes mellitus, investigating the association between uric acid and biomarkers such as fructosamine and HbA1c is of great importance, since these tests are used to monitor blood glucose in these individuals. In addition, there are few references about the interference of uric acid on these biomarkers, as well as limited information about the stability of fructosamine in different storage conditions. Therefore, this study aimed to investigate *in vitro* effect of uric acid on fructosamine and HbA1c, in addition to assessing the impact of different storage conditions and consecutive freeze-thaw cycles on fructosamine. The interference of uric acid was evaluated in pools of serum or blood samples, after the addition of 3.0 mmol/L (50.4 mg/dL) uric acid solution, obtaining a final concentration of 0.55 mmol/L (9.2 mg/dL). Fructosamine was measured by the colorimetric method based on the reduction of nitroblue tetrazolium, using the automated analyzer BS 380® (Mindray). HbA1c was measured using a chromatographic method, via the D10® analyzer (Bio-Rad). To investigate the stability of fructosamine, serum samples were stored at 4° C, -20° C and -80° C for up to 28 days, being analyzed on days 1, 7, 14, 21 and 28. The effect of thermal stress caused by the freezing and thawing of the samples was evaluated after the samples were stored at -20° C or -80° C. Each sample was subjected to three cycles that occurred in a single day, with the fructosamine determination performed after each cycle. The addition of uric acid promoted an 8.3% increase in fructosamine, while HbA1c did not change. In addition, the storage of samples at 4° C, -20° C and -80° C, for up to 4 weeks, had a significant impact on the fructosamine concentration ($P < 0.001$). Significant changes on fructosamine levels were also observed after successive freeze-thaw cycles of the samples at -20° C and -80° C ($P < 0.01$). Thus, high concentrations of uric acid caused an increase in the concentrations of fructosamine, which was not observed in HbA1c. In addition, storage of the serum at different temperatures and conditions significantly altered the concentrations of fructosamine.

Keywords: Fructosamine. HbA1c. Interference. Stability. Uric acid.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Principais atividades realizadas em cada fase analítica.....	16
Figura 2 – Processo de Glicação.....	18

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Figure 1 – Effect of uric acid on fructosamine and HbA1c concentrations in samples spiked with PBS buffer or uric acid standard solution. Uric acid (A) and fructosamine (B) were evaluated in serum samples and HbA1c (C) in the whole blood. The results are expressed as mean and SEM.....	44
---	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Table 1 – Baseline characteristics and biochemical parameters of the study subjects.....	41
Table 2 – Serum fructosamine concentrations ($\mu\text{mol/L}$) obtained in samples stored at 4°C , -20°C and -80°C for up to 28 days.....	42
Table 3 – Effects of freeze-thaw cycles on serum fructosamine concentrations ($\mu\text{mol/L}$) in samples stored at -20°C and -80°C	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i>
AGEs	<i>Advanced Glycation End-products</i>
CLSI	<i>Cinical and Laboratory Standards Institute</i>
DM	<i>Diabetes mellitus</i>
HbA1c	<i>Hemoglobina glicada</i>
NGSP	<i>National Glycohemoglobin Standardization Program</i>

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO.....	12
2	INTRODUÇÃO	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	15
3.1	Fases analíticas.....	15
3.2	Interferentes.....	16
3.3	Avaliação de Interferentes.....	17
3.4	Glicação de proteínas.....	18
3.5	Hemoglobina glicada.....	19
3.6	Frutosamina.....	20
3.7	Interferentes pré-analíticos sobre HbA1c e frutosamina.....	20
3.8	Interferência do ácido úrico no ensaio da frutosamina.....	21
3.9	Estabilidade.....	22
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	Objetivo Geral.....	26
4.2	Objetivos Específicos.....	26
5	MANUSCRITO CIENTÍFICO.....	27
6	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	46

1 APRESENTAÇÃO

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se descritas detalhadamente no **MANUSCRITO CIENTÍFICO**, que será submetido para um periódico da área e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, encontrado no final desta dissertação, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS** referem-se somente às citações contidas no item **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação, de modo que as referências utilizadas para a elaboração do manuscrito estão mencionadas no mesmo.

2 INTRODUÇÃO

A fase pré-analítica é a primeira etapa que integra o processo total que envolve os exames laboratoriais, englobando os procedimentos realizados antes da análise das amostras (HAWKINS, 2012). Muitas variáveis envolvidas nessa etapa interferem diretamente na qualidade amostral, exigindo que os laboratórios sigam as boas práticas de qualidade que garantam a representatividade da amostra e a confiabilidade dos resultados posteriormente obtidos (VON MEYER; CADAMURO, 2019).

Além disso, na etapa seguinte, fatores como a interferência de substâncias endógenas (DEN ELZEN et al., 2018) e exógenas (LUNA-ZÁIZAR et al., 2015) assumem grande importância, uma vez que também podem influenciar nos resultados dos exames. O impacto dessa interferência depende da amplitude de variação do analito dosado, das condições clínicas e do local de assistência ao paciente ou ainda do grau de conhecimento técnico-científico dos profissionais envolvidos, apresentando assim, efeitos variáveis (VASCONCELLOS, 2018). Como resultado, podem-se gerar repetições desnecessárias de testes e custo adicional, além de erros de interpretação nos resultados, levando a diagnóstico incorreto, intervenção inadequada e conclusões prejudiciais para os pacientes (DIMESKI, 2008).

Os estudos de interferência são utilizados a fim de analisar o possível impacto de algumas substâncias sobre determinado analito e devem simular a realidade dos procedimentos de laboratório (DIMESKI, 2008). Por meio desses, tem sido observado o potencial de diversas substâncias (DEN ELZEN et al., 2018; LUNA-ZÁIZAR et al., 2015), entre elas o ácido úrico (CHINH, 1974; WU et al., 2016), de interferir na determinação de parâmetros laboratoriais.

Evidências já demonstraram que concentrações séricas elevadas do ácido úrico, caracterizando quadros de hiperuricemia, têm sido associadas ao diabetes *mellitus* (DM) (CAUSEVIC et al., 2010; DU; MA; ZHANG, 2017). Nesse contexto, parâmetros como a frutossamina e a hemoglobina glicada (HbA1c) assumem destaque por serem biomarcadores utilizados no monitoramento desses indivíduos (RIBEIRO; MACEDO; RAPOSO, 2016).

A frutossamina é uma cetoamina, formada por glicação não enzimática, entre açúcares redutores e proteínas, refletindo níveis médios glicêmicos de curto prazo, uma vez que representa principalmente a meia-vida circulante da albumina, a proteína sérica mais abundante (RIBEIRO; MACEDO; RAPOSO, 2016). Por outro lado, a HbA1c é útil para monitorar os níveis glicêmicos nos três meses anteriores, além de ser utilizado no diagnóstico

do DM (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020). Considerando que informações acerca da interferência da hiperuricemia nesses parâmetros ainda são escassas, torna-se importante investigar essa associação.

Outro parâmetro importante em relação à qualidade da amostra é a estabilidade. Fatores como o armazenamento e os ciclos de congelamento/descongelamento são procedimentos comuns na rotina laboratorial, porém, quando realizados em condições inadequadas podem impactar na concentração de alguns parâmetros bioquímicos. Isso já foi demonstrado através de estudos de armazenamento a curto prazo (IKEDA et al., 2015) e longo prazo (CUHADAR et al., 2013), onde a estabilidade dos analitos foi afetada. Ainda, investigações acerca do efeito do *stress* térmico, causado pelo congelamento e descongelamento de amostras, também já demonstraram alterações nos resultados de parâmetros séricos, dependendo das condições impostas (CUHADAR et al., 2013).

Contudo, apesar dos esforços dispensados na busca por um melhor entendimento sobre condições adequadas de manuseio e armazenamento das amostras, a avaliação da estabilidade dos analitos séricos em geral tem sido realizada por meio de diferentes metodologias. A falta de um protocolo padrão ou consenso dificulta, assim, a determinação dessas condições ideais. Enquanto dados sobre a estabilidade da HbA1c em diferentes condições de armazenamento são conhecidos (BERGMANN; SYPNIEWSKA, 2016; NIAZPOUR et al., 2019), informações a respeito da estabilidade da frutossamina ainda são raras (KOSKINEN; IRJALA, 1988), evidenciando a necessidade de estudos complementares aplicáveis à rotina laboratorial.

Dessa forma, esse estudo buscou investigar a interferência do ácido úrico sobre a frutossamina e a HbA1c, além de avaliar o possível efeito de diferentes condições de armazenamento e dos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a frutossamina sérica.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

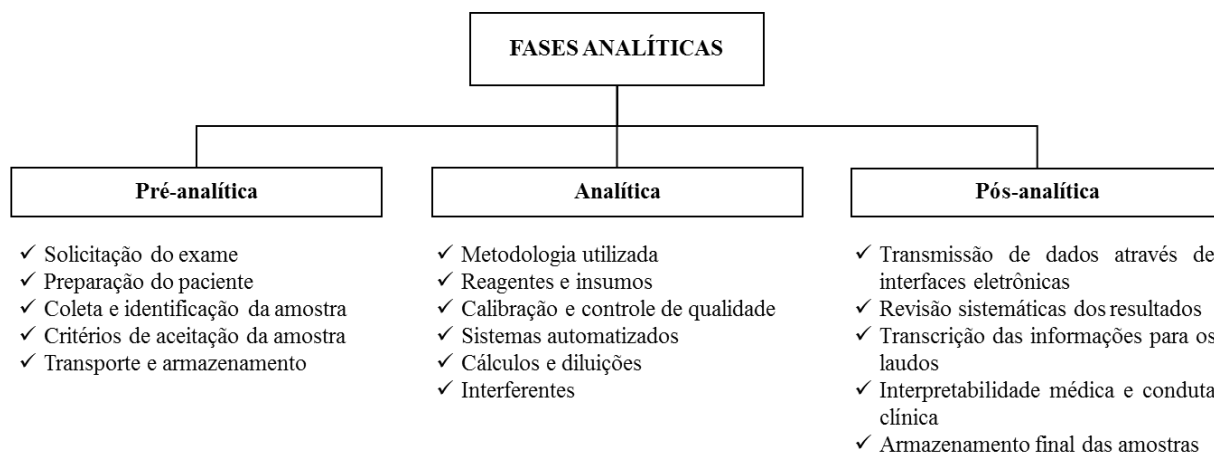
3.1 Fases Analíticas

O processo total que envolve a rotina de exames laboratoriais é composto de três etapas essenciais: pré-analítica, analítica e pós-analítica. A fase inicial, pré-analítica, integra todas as atividades realizadas anteriormente à análise das amostras, sendo as principais a solicitação dos exames, a preparação dos pacientes, os procedimentos de coleta e identificação das amostras, os critérios de aceitação das amostras e o transporte e armazenamento (HAWKINS, 2012).

Posteriormente, a fase analítica é considerada o núcleo do processo laboratorial (PLEBANI, 2010), correspondendo a todas as ações envolvendo a execução do exame propriamente dita, o que inclui metodologias utilizadas, reagentes e insumos, calibração e controle de qualidade, interferentes, cálculos e diluições, sistemas automatizados, entre outros (OLIVEIRA; MENDES, 2010). Por fim, atividades relacionadas à conclusão da fase analítica até o recebimento dos resultados dos exames pelo médico solicitante compreendem a fase pós-analítica. Transmissão de dados através de interfaces eletrônicas, revisão sistemáticas dos resultados, transcrição das informações para os laudos, interpretabilidade médica, conduta clínica e armazenamento final das amostras são algumas das ações realizadas nessa etapa (HAWKINS, 2012).

Conhecer e entender todas as variáveis que controlam esse processo na íntegra é de extrema importância para os laboratórios clínicos. Esses, por meio da excelência em seus métodos, visam inibir a ocorrência de erros e atestar a confiabilidade dos resultados, garantindo a segurança dos pacientes. Sabidamente, os erros em medicina laboratorial podem ocorrer em ambas as fases analíticas. Entretanto, devido aos inúmeros fatores envolvidos, a etapa pré-analítica é considerada a mais vulnerável, contribuindo majoritariamente para a taxa geral de erros diagnósticos e terapêuticos (CARRARO; PLEBANI, 2007; SCHIFF et al., 2009). De modo geral, interferência e instabilidade são os principais componentes implicados nas possíveis variações observadas, dentro do processo total (GÓMEZ RIOJA et al., 2018).

Figura 1. Principais atividades realizadas em cada fase analítica.



Arte: Autor.

3.2 Interferentes

Interferentes analíticos são substâncias presentes em uma matriz amostral, que podem interagir com reagentes ou com sistemas de detecção de métodos analíticos, alterando falsamente o resultado de um analito. Essas substâncias podem ser de origem endógena, presentes na amostra biológica ou exógena, que compreendem substâncias consumidas pelo paciente ou introduzidas na amostra biológica (KROLL; ELIN, 1994). Independentemente da origem, a interferência pode ocorrer através de mecanismos variados, como competição ou inibição enzimática, reações cruzadas ou ainda interferências físicas como alteração da viscosidade e turbidez (VASCONCELLOS, 2018).

Várias substâncias endógenas (DEN ELZEN et al., 2018; WARD et al., 2017), entre elas o ácido úrico (CHINH, 1974), podem atuar como interferentes na quantificação de analitos laboratoriais. Hemólise, icterícia e lipemia estão entre as principais substâncias interferentes mencionadas na literatura (CARGNIN et al., 2016). Por outro lado, medicamentos (LUNA-ZÁIZAR et al., 2015) e processos pré-analíticos, bem como aditivos e conservantes presentes nos frascos de coleta (BOWEN; REMALEY, 2014) são exemplos conhecidos de interferentes exógenos.

Recentemente, com o progresso tecnológico, metodologias foram desenvolvidas com o intuito de quantificar os índices séricos dos principais interferentes já citados, com alta precisão e assim, amenizar os possíveis erros na mensuração de alguns analitos, proporcionando melhorias substanciais ao processo analítico. Essa quantificação pode ser

realizada espectrofotometricamente, por alguns sistemas automatizados, em amostras de soro ou plasma. Os índices são expressos de forma numérica, apresentando uma correlação quase linear com concentrações crescentes do composto interferente específico, possibilitando assim, a correção simultânea do resultado do analito de interesse, por meio de equações, dentro de um possível intervalo aceitável. Entretanto, quando o nível de interferência se apresenta elevado, o sistema sinaliza para a rejeição da amostra e a necessidade de coleta de uma nova amostra deve ser avaliada (FARRELL; CARTER, 2016).

3.3 Avaliação de Interferentes

Os estudos de interferência são utilizados a fim de analisar o possível impacto de algumas substâncias em função de sua concentração sobre determinado analito pretendido. Cabe ressaltar que os mesmos devem simular a realidade dos procedimentos de laboratório. Assim, inicialmente é importante assegurar que os processos operacionais envolvidos, principalmente nas fases pré-analítica e analítica, estejam devidamente padronizados (DIMESKI, 2008).

Para determinar o efeito causado pelo interferente, são utilizadas amostras biológicas individuais, pools de amostras ou soluções-padrão. A respeito da solução interferente, é recomendado utilizar uma solução-padrão para materiais solúveis, devendo o volume adicionado ser baixo, com o intuito de evitar uma alta diluição da amostra biológica a ser testada. O método utiliza alíquotas das amostras ou soluções-padrão, enriquecidas com níveis conhecidos crescentes do interferente, seguido da avaliação do desvio padrão e coeficiente de variação calculados a partir das leituras do analito na presença e ausência do interferente. Ademais, preferencialmente, as dosagens devem ser realizadas em duplicata. Para a análise das diferenças entre os resultados das amostras, pode ser utilizado o teste t de Student pareado, observando-se um nível de significância quando $P < 0,05$ (VASCONCELLOS, 2018). A representação do viés entre as leituras pode ser apresentada através de gráficos chamados de interferogramas (GLICK; RYDER; JACKSON, 1986).

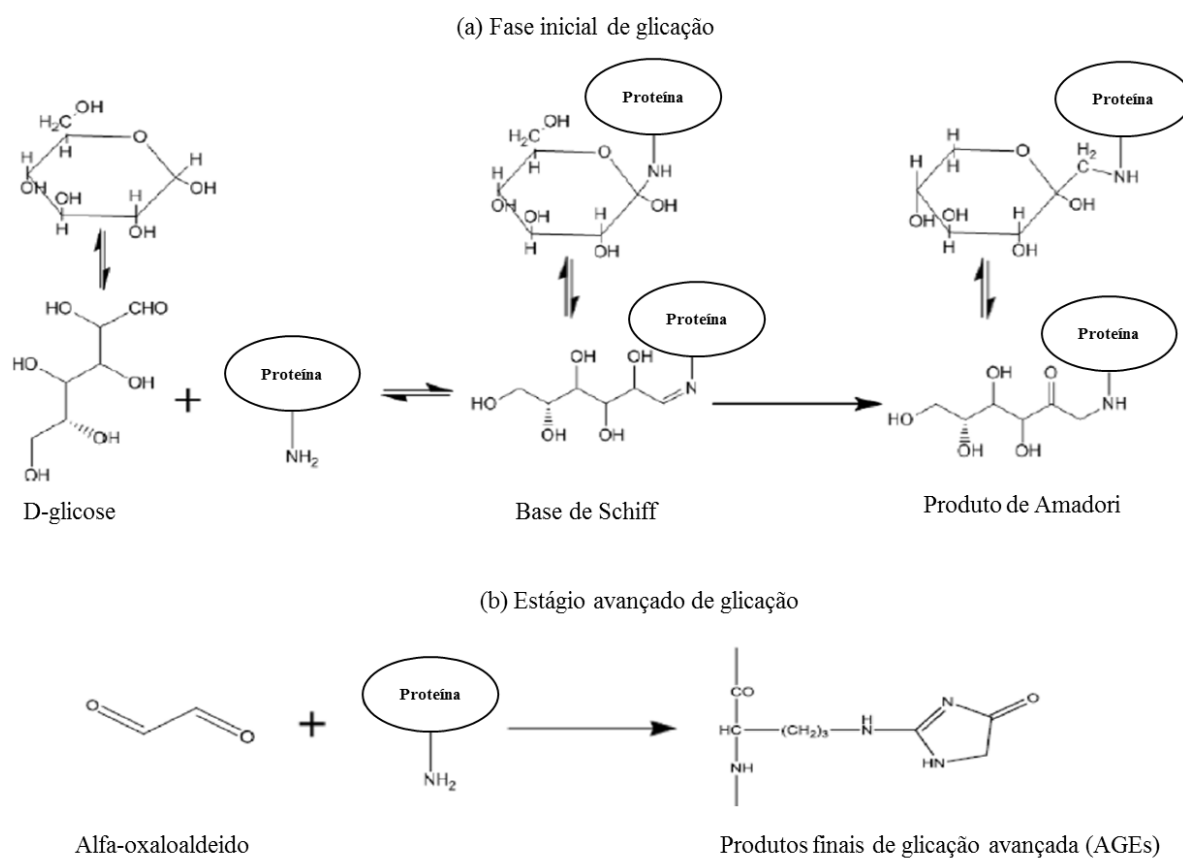
Embora inúmeros estudos tenham demonstrado o potencial efeito interferente de substâncias sobre diversos parâmetros laboratoriais (DEN ELZEN et al., 2018; LUNA-ZÁIZAR et al., 2015; WARD et al., 2017), investigações *in vitro* acerca da interferência do ácido úrico sobre biomarcadores glicêmicos como a frutossamina e a HbA1c ainda são escassas.

3.4 Glicação de Proteínas

O processo de glicação envolve reações não enzimáticas desencadeadas pela adição de resíduos de açúcares redutores, como a glicose, a grupos amino livres de proteínas, como a albumina e a hemoglobina (TAGHAVI et al., 2017). Essas reações ocorrem fisiologicamente, mas estão consideravelmente aumentadas em quadros de hiperglicemia ou estresse oxidativo (FORBES; COOPER, 2013).

Inicialmente, a adição do açúcar redutor à proteína leva à formação de uma estrutura instável, denominada base de Schiff, a qual, em seguida, em uma reação irreversível, sofre um rearranjo originando o produto de Amadori (Figura 2a), que tem como exemplos conhecidos a frutosamina e a HbA1c. Posteriormente, os grupos carbonila reativos desses produtos de Amadori se condensam com grupos amino primários, originando os produtos finais de glicação avançada (AGEs [do inglês, *Advanced Glycation End-products*]) (Figura 2b), os quais estão relacionados a diversos distúrbios patológicos, entre eles o DM (CHAUDHURI et al., 2018; MONNIER, 2003).

Figura 2. Processo de Glicação



Fonte: Adaptado de ANGUIZOLA et al., 2013.

3.5 Hemoglobina Glicada

A incidência do DM é crescente, tendo atingido até o ano de 2017 aproximadamente 425 milhões de pessoas, evidenciando uma epidemia global (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). Além de ser amplamente utilizado para o monitoramento do *status* glicêmico em indivíduos diabéticos, a partir da última década, o ensaio de HbA1c passou a ser reconhecido por agências reguladoras como critério de diagnóstico para essa síndrome metabólica (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020; JIA, 2016).

A HbA1c, formada continuamente *in vivo*, origina-se do processo de glicação não enzimática através da ligação de açúcares com a hemoglobina A (HbA), forma principal e nativa da proteína hemoglobina. Mais especificamente, A1c é a fração da hemoglobina A1 onde se localiza a ligação estável e irreversível da porção terminal valina da cadeia beta com o açúcar, formando a HbA1c propriamente dita (BUNN et al., 1976; NETTO et al., 2009). Esta glicação, que ocorre com mais frequência na presença de hiperglicemia, é responsável por alterações estruturais e funcionais nos tecidos, contribuindo para o desenvolvimento dos distúrbios crônicos associados ao DM (FORBES; COOPER, 2013), o que justifica a mensuração e utilização dessa fração da hemoglobina como preditivo de complicações da doença (DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP et al. 1993; UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY, 1995).

Além disso, a HbA1c é considerada um marcador de longo prazo, já que seus níveis sanguíneos estão relacionados ao tempo de vida das hemácias, que circulam por aproximadamente 106 dias com uma variação de $\pm 20\%$, expressando uma média de glicemia nos 3 a 4 meses anteriores ao teste, o que a torna um indicador mais constante do que a glicemia de jejum (ENGLISH; LENTERS-WESTRA, 2018).

Devido à grande relevância envolvendo o acompanhamento e tratamento do DM a nível mundial, muitos ensaios laboratoriais passaram a ser disponibilizados para a mensuração da Hb1Ac, o que levou ao surgimento do *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP), cuja finalidade é comparar e certificar os diversos métodos utilizados para dosagem desse analito. Assim, várias metodologias baseadas na separação das frações de Hb1Ac ou baseadas em reações químicas são aceitas pelo NGSP, embora a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) seja atualmente considerada a técnica padrão ouro (WEYKAMP, 2013).

3.6 Frutosamina

A frutosamina é uma cetoamina formada por reações de glicação entre um açúcar redutor e uma amina primária, determinando assim a fração de proteínas séricas glicadas de um modo geral. É constituída quase na sua totalidade pela proteína albumina, que possui tempo de meia vida de aproximadamente 20 dias. Dessa forma, o ensaio de frutosamina indica um nível glicêmico médio de aproximadamente 3 semanas. Uma das principais indicações desse ensaio é avaliar a necessidade ou não de modificações na conduta terapêutica de pacientes hiperglicêmicos, a fim de constatar a eficácia do tratamento (DANESE et al., 2015; RIBEIRO; MACEDO; RAPOSO, 2016).

Além disso, a dosagem de frutosamina pode ser uma opção em situações nas quais a credibilidade do ensaio de HbA1c é comprometida por condições que interferem neste parâmetro, como anemias, hemoglobinopatias e/ou diminuição dos valores de eritropoetina e esplenectomia, responsáveis por alterar o tempo de meia vida das hemácias (DING et al., 2018; RADIN, 2014). Nesse contexto, embora a HbA1c seja comumente utilizada na avaliação da glicemia média em indivíduos com DM, a *American Diabetes Association (ADA)* sugere a avaliação de outros marcadores glicêmicos como a frutosamina e a albumina glicada (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2020).

Em geral, o método colorimétrico usado para a quantificação da frutosamina está baseado na capacidade das cetoaminas em reduzir o azul de nitrotetrazólio (NBT) numa solução alcalina, sendo a taxa de formação do complexo púrpura diretamente proporcional à concentração de proteínas glicadas (LABTEST DIAGNÓSTICA, 2020; MONTAGNANA et al., 2013).

3.7 Interferentes pré-analíticos sobre HbA1c e frutosamina

Sabidamente a presença de formas variadas da proteína hemoglobina (hemoglobinas variantes) pode impactar de maneira divergente nos diferentes métodos analíticos disponíveis para a determinação de HbA1c (GIARDINE et al., 2014). A interação de alguns métodos certificados pelo NGSP, entre eles o imunoensaio e a cromatografia líquida de troca iônica, com as formas mais comuns de hemoglobina variante é bem conhecida (NATIONAL GLYCOHEMOGLOBIN STANDARDIZATION PROGRAM, 2016).

Normalmente a presença de hemoglobinopatias não invalida o resultado de HbA1c, no entanto, cabe ao médico estar sempre em estreito contato com o laboratório, a fim de que os

casos complexos sejam avaliados conjuntamente. Embora, na maioria dos casos, as hemoglobinopatias presentes em heterozigose não inviabilizem a utilização da HbA1c, nas formas raras homozigotas de hemoglobina anormal (CC, SS, EE) não há HbA presente. Dessa forma, o valor de HbA1c não pode ser quantificado, uma vez que a vida útil dos eritrócitos apresenta variações sob essas condições (MAYO CLINIC, 2019).

Outros interferentes que diminuem a dosagem de HbA1c são a anemia hemolítica ou estados hemorrágicos, os quais reduzem o tempo de vida útil dos eritrócitos. Além disso, elevadas doses de vitaminas C e E (ex.: vitamina C > 20 g/dia) podem inibir a glicação da hemoglobina (KRONE; ELY, 2004). Por outro lado, podem elevar os níveis de HbA1c interferentes como: hipertrigliceridemia grave (>2.000 mg/dL, por afetar a turbidez da amostra), hiperbilirrubinemia (>50 mg/dL), alcoolismo crônico (pela interação do acetaldeído com a hemoglobina, que pode elevar o nível de HbA1), ingestão crônica de salicilatos (3 a 6 g/dia), anemia ferropriva, fenobarbital (por elevar a reatividade da glicose à hemoglobina) e insuficiência renal (através da hemoglobina carbamilada) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES, 2020).

Em contrapartida, raros estudos demonstraram o efeito interferente de substâncias sobre o ensaio de frutosamina. Entre esses, Baker et al. (1985) observaram que uma concentração de aproximadamente 428 $\mu\text{mol/L}$ de bilirrubina total resultou na elevação significativa da concentração sérica de frutosamina. Além disso, outros compostos como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (5,5 g/L), heparina (80.000 units/L), cisteína (0,5 mmol/L), ácido ascórbico (0,57 mmol/L) e o urato (0,93 mmol/L) também afetaram os valores deste marcador glicêmico, porém com efeito menos pronunciado. Valores aumentados de frutosamina após a adição de urato (1,08 mmol/L), bilirrubina total (0,25 mmol/L) e glutatona (6,5 mmol/L) também foram observados por CHUNG; LEES; GUTMAN (1988). No entanto, o ácido ascórbico (0,57 mmol/L) resultou em uma diminuição nos valores de proteínas glicadas. Ademais, relatos prévios indicam que drogas como o captopril e a penicilamina podem impactar nos níveis de frutosamina, dependendo da concentração utilizada do fármaco (RUMLEY; PATERSON, 1990).

3.8 Interferência do ácido úrico no ensaio de frutosamina

O ácido úrico (2,6,8-trioxipurina, $\text{C}_5\text{H}_4\text{N}_4\text{O}_3$) é um composto orgânico heterocíclico que apresenta peso molecular de 168 Da. Em condições fisiológicas de pH, esse ácido fraco é encontrado no sangue principalmente sob a forma de urato, cujos valores séricos encontrados

em indivíduos saudáveis são de 0,21 a 0,42 mmol/L (3,5 a 7,1 mg/dL) para homens e 0,15 a 0,36 mmol/L (2,5 a 6,0 mg/dL) para mulheres (BENN et al., 2018). Quanto a solubilidade do ácido úrico em água, suas concentrações aproximam-se de 0,42 mmol/L (7,1 mg/dL) sendo que, valores acima desse limiar, caracterizam quadros de hiperuricemia. Sua síntese é decorrente do catabolismo das purinas endógenas e exógenas, sendo realizada principalmente a nível hepático (JALAL et al., 2011). Já sua excreção, se dá através dos rins e intestinos (OLIVEIRA; BURINI, 2012).

Investigações *in vitro* demonstram um efeito interferente do ácido úrico sobre a frutossamina (BAKER et al., 1985; CHUNG; LEES; GUTMAN, 1988; KALLNER, 1989). Em um estudo envolvendo indivíduos não diabéticos, foi observada uma interferência nos valores de frutossamina, após a adição de urato nas amostras em uma concentração final de 0,93 mmol/L (BAKER et al., 1985). Além disso, evidências indicam que, em pools de soro normal, concentrações finais de 1,08 mmol/L de ácido úrico resultaram em alterações na frutossamina (CHUNG; LEES; GUTMAN, 1988). Ainda, relatos mostraram que mesmo concentrações fisiológicas crescentes de urato, impactaram nas concentrações séricas de frutossamina (KALLNER, 1989).

Diante disso, melhorias na padronização do ensaio de frutossamina sugerem que a utilização da enzima uricase associada aos demais reagentes presentes nos kits comerciais pode amenizar ou até mesmo inibir o efeito interferente do ácido úrico, possibilitando a quantificação do analito de forma mais precisa e exata (SCHLEICHER; VOGT, 1990). Nesse sentido, alguns kits comerciais incluíram a uricase em sua constituição (LABTEST DIAGNÓSTICA, 2020; ROCHE, 1999).

3.9 Estabilidade

Assim como a interferência, a estabilidade também é um parâmetro importante em relação à qualidade amostral, pois principalmente fatores como o armazenamento sob condições inadequadas de tempo e temperatura (IKEDA et al., 2015) e ciclos de congelamento/descongelamento das amostras (CUHADAR et al., 2013) podem impactar na concentração de vários parâmetros bioquímicos. Outras condições que aceleram o metabolismo dos analitos ou interferem nas suas características iniciais, tais como, exposição à luz, evaporação e agitação também podem afetar a estabilidade (GÓMEZ RIOJA et al., 2018).

A estabilidade é caracterizada pela capacidade que os constituintes da amostra têm de preservar suas propriedades iniciais, dentro dos limites de variação aceitável, durante um intervalo de tempo, sob condições específicas (GÓMEZ RIOJA et al., 2018). Informações sobre a estabilidade de testes bioquímicos em amostras, no que diz respeito às condições ideais de armazenamento, são de grande relevância no contexto da medicina laboratorial, uma vez que frequentemente espécimes precisam ser armazenadas por um determinado período, antes e após os ensaios. Essas situações ocorrem, geralmente, quando há necessidade de acúmulo de amostras para dosagens em lote ou quando do envio das mesmas para laboratórios de apoio. Além disso, após as análises, o armazenamento das amostras é realizado para assegurar repetições, caso necessário, e pedidos complementares (GRANKVIST et al., 2019).

Nesse contexto, para assegurar a confiabilidade dos resultados, é necessário garantir a estabilidade das amostras durante o período em que as mesmas ficam armazenadas. Usualmente, sugere-se que os laboratórios clínicos utilizem para esse fim os seguintes limites de temperatura: 18 a 25° C (ambiente) por até 8 horas, 4 a 8° C (refrigerado) por até 48 horas e -20° C (congelado), durante períodos maiores, salvo exceções de algumas enzimas. A maior parte dos analitos presentes no soro se mantêm estável por alguns dias quando refrigerados, enquanto outros se mantêm por um intervalo de tempo maior, se congelados. A escolha da temperatura depende das biomoléculas de interesse e da duração prevista do armazenamento (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2004). Temperaturas mais negativas como -80° C, são indicadas para o armazenamento a longo prazo (RAI et al., 2005).

Embora sejam conhecidas diversas fontes de informação referentes à estabilidade analítica em amostras séricas, incluindo bulas de kits comerciais, manuais de referência em bioquímica e diretrizes, além da literatura publicada, não há um consenso sobre como realizar a avaliação da estabilidade dos analitos séricos em geral. Isso ocorre devido à ausência, na maioria dos estudos, de uma definição robusta para estabilidade, um elemento indispensável para a orientação da metodologia adequada, levando a uma variabilidade dos métodos utilizados e resultados encontrados.

Em geral, os estudos visam investigar a estabilidade do analito durante curto prazo (IKEDA et al., 2015; LEE et al., 2010), buscando refletir a rotina dos laboratórios clínicos, ou durante longo prazo (BRINC et al., 2012; CUHADAR et al., 2013), sendo esses mais relevantes em biobancos para fins de pesquisas.

Relatos demonstraram que, em um estudo de proteômica, o armazenamento de amostras de soro sob diferentes condições (22 a 24° C, 4° C e -20° C) afetou os valores de alguns subconjuntos de proteínas, especialmente nas temperaturas mais elevadas (LEE et al.,

2010). Em adição, outro estudo avaliou, em diferentes temperaturas de armazenamento, a estabilidade de analitos em espécimes clinicamente relevantes como soro, sangue total e urina, por até 7 dias. Nesse, foram observados que em geral, os mesmos apresentaram mais suscetibilidade a desnaturação sob condições ambientes (23° C), seguido de refrigeração (4° C) e congelamento (-20° C) (IKEDA et al., 2015).

Por outro lado, relatos prévios apontaram o impacto da estocagem de amostras séricas a -20° C, sobre alguns parâmetros bioquímicos, resultando em alterações significativas nos valores de proteínas totais e albumina, após períodos superiores a 3 meses (CUHADAR et al., 2013). Ademais, um estudo de grande dimensão envolvendo amostras pediátricas de soro, testou a estabilidade de 57 analitos bioquímicos, entre eles, proteínas e hormônios, após o armazenamento a -80° C por longos períodos. A maioria dos parâmetros avaliados, por até 13 meses, não apresentou variação significativa ao longo do tempo, sugerindo que a condição testada é indicada como ideal para a preservação das amostras séricas envolvendo biobancos (BRINC et al., 2012).

Escassas evidências relacionadas à estabilidade da frutossamina sérica demonstraram que o congelamento, a -20° C e -70° C, de amostras de indivíduos com DM tipo I e II por longos períodos, afetou as concentrações desse analito (KOSKINEN; IRJALA, 1988). Contudo, a falta de dados complementares acerca da estabilidade desse marcador de controle glicêmico indica a necessidade de investigações adicionais, buscando padronizar as condições analíticas ideais de estocagem das amostras.

Outro aspecto a ser considerado com relação ao armazenamento é o congelamento e descongelamento repetido das amostras, uma prática mais rotineira em pesquisa, mas, por vezes, necessária nos laboratórios clínicos, em virtude de que determinados analitos necessitam ser estocados sob temperaturas negativas, por apresentarem estabilidade reduzida em temperatura ambiente ou refrigeração (IKEDA et al., 2015). Entretanto, conforme tem sido demonstrado, esse procedimento pode impactar de maneira significativa sobre as concentrações de alguns parâmetros. Nesse contexto, ciclos sucessivos de congelamento a -25° C e descongelamento a temperatura ambiente, em amostras de soro, causaram alterações significativas nos valores de bilirrubina e sódio (GISLEFOSS et al., 2017). Ademais, estudos prévios demonstraram aumentos significativos na atividade da renina plasmática, além de alterações menos expressivas do hormônio adrenocorticotrófico após repetidos ciclos (HILLEBRAND; HEIJBOER; ENDERT, 2017).

Diante do apresentado e das limitadas informações, é de grande importância investigar a possível relação entre um incremento na concentração de ácido úrico, simulando quadros de

hiperuricemia observados na rotina, e biomarcadores relacionados ao *status* glicêmico como a frutossamina e a HbA1c. Além disso, definir a temperatura ideal de armazenamento das amostras de soro para a quantificação da frutossamina é imprescindível para evitar a possível degradação prévia do analito.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito *in vitro* do ácido úrico sobre a frutossamina e a HbA1c, bem como o impacto do armazenamento das amostras em diferentes temperaturas e de sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento sobre a frutossamina sérica.

4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Avaliar a potencial interferência *in vitro* do ácido úrico sobre as concentrações séricas de frutossamina e níveis sanguíneos de HbA1c.

- Verificar o impacto *in vitro* do armazenamento de amostras de soro nas temperaturas de 4° C, -20° C e -80° C, por até 28 dias, sobre a estabilidade da frutossamina.

- Investigar o efeito de consecutivos ciclos de congelamento/descongelamento nas temperaturas de -20° C e -80° C sobre as concentrações séricas de frutossamina.

5 MANUSCRITO CIENTÍFICO

In vitro interference of uric acid on fructosamine and HbA1c

Rogério Scolari^{a,b}, José P.E. Cassol^a, Carolina S. Stein^a, José A.M. de Carvalho^{a,b}, Rafael N. Moresco^{a,*}

^aLaboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

^bUniversity Hospital, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

***Corresponding Author:** Prof. Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1401, Camobi, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

Phone: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018; E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Word count: 1858

Number of tables: 3

Number of figures: 1

References: 31

Abstract

Background: Increased concentrations of uric acid may affect the measurement of some analytes. In this study, we investigated the *in vitro* effects of uric acid on fructosamine and HbA1c levels. Additionally, we assessed the impact of storage and successive freeze-thaw cycles on serum fructosamine levels.

Methods: We pooled serum and blood samples separately from 18 subjects. Pools were spiked with phosphate buffer saline or uric acid standard (3.0 mmol/L) at a ratio of 1:9 and incubated for 5 min. Thereafter, fructosamine, HbA1c, and uric acid concentrations were measured. To investigate the fructosamine stability, serum samples collected from volunteers were stored at 4°C, -20°C, and -80°C for 28 days. Fructosamine concentrations were measured after 1, 7, 14, 21, or 28 days of storage. Additionally, the serum samples were submitted to three consecutive freeze-thaw cycles at -20°C and -80°C before fructosamine measurement.

Results: Addition of uric acid promoted a significant increase of 8.3% in serum fructosamine levels, whereas the HbA1c levels remained unaltered. Storage at 4°C, -20°C, and -80°C for up to 4 weeks significantly affected ($P < 0.001$) serum concentrations of fructosamine causing changes, which ranged from 0.2% to 25.2%. The consecutive freeze-thaw cycles at -20°C and -80°C also promoted significant changes ($P < 0.01$) in serum fructosamine levels.

Conclusions: High concentrations of uric acid promotes an increase in serum fructosamine concentration but does not affect HbA1c levels. Moreover, storage of serum under different temperatures and storage conditions significantly changes the concentration of fructosamine in the serum.

Keywords: Fructosamine; HbA1c; Interference; Stability; Uric acid.

List of Abbreviations

ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
BMI	Body mass index
DM	Diabetes mellitus
eGFR	Estimated glomerular filtration rate
HPLC	High performance liquid chromatography
NBT	Nitroblue tetrazolium
NGSP	National Glycohemoglobin Standardization Program
PBS	Phosphate buffer saline

Introduction

The pre-analytical phase is one of the three steps required for most laboratory tests and is the most susceptible to errors due to the factors that can degrade sample quality [1, 2]. Among these factors, the presence of several substances and debris in serum samples interferes with the quantification of the biochemical analytes [3, 4]. Hemolysis, icterus, and lipemia are the most common interfering substances in samples [5, 6]. Uric acid may affect the *in vitro* measurement of some markers, impacting the clinical interpretation of results in hyperuricemic individuals [7]. Uric acid also interferes in the measurement of glucose when using the oxidase-peroxidase method [8]. However, the *in vitro* effects of uric acid on markers such as fructosamine and HbA1c are scarce. As hyperuricemia is one of the findings associated with diabetes [9, 10], it is important to investigate the impact of uric acid on the concentrations of fructosamine and HbA1c, both of which are commonly used to monitor patients with diabetes.

Other factors, such as inadequate storage [11, 12] and successive freeze-thaw cycles [13] of samples, influence the stability and quantification of some biochemical parameters. Information on the stability of HbA1c under different storage conditions is available [14, 15]. However, the stability of fructosamine under different storage conditions and successive freeze-thaw cycles is unknown [16]. The present study investigated the *in vitro* interference of uric acid on fructosamine and HbA1c, as well as the impact of storage of samples at different conditions and the successive freeze-thaw cycles on serum fructosamine.

Materials and methods

Study population

This study included 18 subjects aged 18 to 60 years, enrolled at the University Hospital of Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. No recruited participants were pregnant or affected

by infectious diseases, neoplasms, or liver disease. Blood was obtained from all subjects, using the venous puncture technique, after at least 8 h overnight fasting, into either Vacutainer[®] (BD Diagnostics, New Jersey, USA) tubes containing EDTA or tubes without anticoagulant. Serum was obtained after centrifugation of blood at $2500 \times g$ for 15 min. All eligible subjects provided informed written consent, and this study was approved by the Human Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria (number 11559119.4.0000.5346).

Baseline laboratory measurements

Routine laboratory parameters such as glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol, HDL cholesterol, triglycerides, and creatinine were measured in serum using commercial assays (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) on the BS 380 Automated Analyzer (Mindray, Shenzhen, China). Serum uric acid was measured using the Dimension RxL Max Automated Analyzer according to the manufacturer's instructions (Siemens Healthcare Diagnostics Inc., Pennsylvania, USA). Low-density lipoprotein (LDL) cholesterol was calculated using the Friedewald formula [17]. The glomerular filtration rate (GFR) was estimated using the Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) creatinine equation [18].

Effects of uric acid on fructosamine and HbA1c

This investigation was carried out in pooled serum (n=6) and blood samples (n=6). A uric acid solution (3.0 mmol/L, 50 mg/dL) in 0.1 M phosphate buffer saline (PBS), pH 7.4, was prepared. Initially, each pool was divided into two aliquots, with each spiked with either PBS or uric acid at a proportion of 1 part of the solution to 9 parts of serum (1:9), and incubated at 37°C for 5 min. Next, fructosamine, HbA1c, and uric acid concentrations were assessed in all

aliquots. Fructosamine was measured with a colorimetric method based on nitroblue tetrazolium (NBT) dye reduction using a commercial assay (Bioclin, Belo Horizonte, Brazil) on the BS 380 Automated Analyzer. Blood HbA1c was measured using a chromatographic method on the D10 Automated Analyzer (Bio-Rad, California, USA). Uric acid was quantified as previously described.

Stability of serum fructosamine

Serum samples from all individuals were aliquoted in microtubes and kept at temperatures of 4°C, -20°C, and -80°C for up to 28 days. On days 1, 7, 14, 21, and 28, samples were thawed in at 37°C for 15 min, vortexed, and serum fructosamine was measured.

Effect of freeze-thaw cycles on serum fructosamine

After the measurement of basal fructosamine on fresh samples, each sample was divided into two aliquots, which were then stored at either -20°C and -80°C. Every 75 min, the samples were submitted to a thawing cycle at 37°C for 15 min, followed by fructosamine measurement. Subsequently, the samples were refrozen at -20°C and -80°C, and a new freeze-thaw cycle was performed. Each sample was subjected to three consecutive cycles of freezing and thawing that occurred on the same day.

Statistical analysis

All variables were tested for normality using the D'Agostino and Pearson omnibus test. Continuous parametric data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or mean \pm standard error of the mean (SEM). The non-parametric variables were presented as median and interquartile ranges. The effects of uric acid on fructosamine and HbA1c concentrations were analyzed using the paired Student's *t*-tests. One-Way Repeated-Measures Analysis of

Variance (ANOVA) was performed to evaluate the influence of storage conditions on the stability of fructosamine and freeze-thaw cycles on the concentrations of this analyte. A $P < 0.05$ was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism[®] version 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

Results

The general characteristics and biochemical parameters of the study population are shown in Table 1. The addition of the standard uric acid solution to the samples resulted in a significant increase of approximately 140% in the concentration of uric acid compared to the baseline values (Figure 1A). Interestingly, the addition of uric acid promoted a significant increase of 8.3% in the concentrations of fructosamine (Figure 1B), whereas HbA1c concentrations did not change (Figure 1C).

The serum fructosamine concentration observed in fresh samples was $276 \pm 61 \mu\text{mol/l}$. When subjected to storage at 4°C , up to 28 days, fructosamine concentrations decreased by 1.2% to 19.2% compared with the baseline value. Storage at the temperatures of -20°C and -80°C decreased fructosamine concentrations in the samples by 2.6% to 25.2% and 0.2% to 23.4%, respectively (Table 2). Regarding the freeze-thaw investigation, samples stored at -20°C showed increases of 4.6%, 3.3%, and 5.4% in cycles 1, 2, and 3, respectively, compared to baseline fructosamine concentrations. Furthermore, at -80°C , the increment observed was 4.0%, 2.3%, and 4.0% in cycles 1, 2, and 3, respectively (Table 3).

Discussion

This study reported that the addition of uric acid to serum samples in concentrations compatible with hyperuricemia promoted an increase of fructosamine, whereas HbA1c did not present with similar changes. Although uric acid interferes with fructosamine

quantification [19, 20], to our knowledge this is the first study that demonstrated the simultaneous impact of uric acid at concentrations comparable to a hyperuricemic state on fructosamine and HbA1c, which are parameters that are widely used for the monitoring of diabetes. Furthermore, the storage of samples at different temperatures for up to four weeks, as well as the successive freeze-thaw cycles of samples, promoted significant changes in fructosamine concentrations. Among the temperatures investigated, 4°C and -20°C reflected the main storage conditions available in most laboratories [21]. Furthermore, the effects of storage at -80°C was investigated because this is the recommended temperature for the maintenance of analyte stability for longer storage periods [13, 22].

High concentrations of uric acid interfere with the measurement of fructosamine, but the exact mechanisms for this remain poorly understood [19, 20]. In previous *in vitro* investigations used high uric acid concentrations (0.93 mmol/L [19] and 1.08 mmol/L [20]), incomparable to levels seen in patients with hyperuricemia. In the present study, the final uric acid concentration used was 0.55 mmol/L (9.2 mg/dL), which was representative of serum uric acid concentrations seen in many patients. We observed uric acid interference on fructosamine measurement at these levels. This interference may have occurred due to interactions between uric acid and NBT. Generally, fructosamine is measured using a colorimetric assay based on the reduction of NBT, where the formation of a purple complex is directly proportional to the concentration of the analyte [23]. We hypothesize that uric acid may react with the dye potentiating the reaction and formation of the purple complex, promoting falsely high values of fructosamine. Interestingly, some evidence indicates that the addition of the enzyme uricase could mitigate or even eliminate uric acid interference in these colorimetric assays [24, 25]. In this sense, available commercial assays of fructosamine include uricase in their constitution [26].

Alternatively, blood concentrations of HbA1c were not affected by high uric acid values. This may be attributed to the methodology used for the HbA1c measurement. The method was based on ion-exchange high performance liquid chromatography (HPLC) with high sensitivity and specificity for the analyte, certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP) and the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) [27]. The analyzer we used automatically injects the samples into a cartridge where the hemoglobin is separated into different fractions using a buffer gradient with increasing ionic strength, then measured spectrophotometrically [28]. The absence of interference of uric acid on HbA1c in this study corroborates the preferential use of this marker in the clinical evaluation of hyperglycemic individuals [29].

The storage of serum samples for up to 28 days at temperatures of 4°C, -20°C, and -80°C, as well as the consecutive freeze-thaw cycles of samples induced significant changes in fructosamine concentrations. Since proteins may suffer structural changes and degradation under certain conditions [30, 31], the sample storage may have caused conformational changes and protein degradation, affecting the binding of the proteins to glucose molecules, promoting a decrease in the formation of fructosamine. Consecutive freeze-thaw cycles of the samples promoted small but significant changes in fructosamine concentrations. The freeze-thaw cycles were performed on the same day as the sample collection to minimize interference from other factors such as inter-assay variations and storage duration. The freeze-thaw cycles may also have caused some conformational changes in protein structure, especially albumin, which may have contributed to the change in the degree of glycation of these proteins.

We have shown that the addition of uric acid to serum samples promoted an increase in serum fructosamine, unlike HbA1c. Patients with hyperuricemia may present overestimated values of fructosamine, resulting in an incorrect assessment of glycemic control. For this

population, the use of HbA1c as a marker is recommended given its accuracy in the presence of uric acid. The storage of samples at different temperatures and freeze-thaw cycles resulted in changes in serum fructosamine. Although the changes were discreet, they were significant, indicating a preference for analyte quantification in fresh samples. However, further investigation about the mechanisms involved in the interference of uric acid on serum fructosamine in the hyperuricemic population is warranted.

Acknowledgement

The authors thank Bioclin/Quibasa (Belo Horizonte, Brazil) for providing the biochemical reagents. R. N. Moresco is recipient of a research productivity scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, number 309799/2017-1).

Author contributions: All the authors have accepted responsibility for the entire content of this submitted manuscript and approved submission.

Research funding: None declared.

Employment or leadership: None declared.

Honorarium: None declared.

Competing interests: The funding organization(s) played no role in the study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; or in the decision to submit the report for publication.

References

1. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem* 2002;48:691-8.
2. Von Meyer A, Cadamuro J. The preanalytical phase – a field for improvement. *Diagnosis (Berl)* 2019;6:1-3.
3. Den Elzen WP, Cobbaert CM, Gunnewiek JM, Bakkeren DL, Van Berkel M, Frasa MA, et al. Glucose and total protein: Unacceptable interference on Jaffe creatinine assays in patients. *Clin Chem Lab Med* 2018;56:185-7.
4. Luna-Záizar H, Virgen-Montelongo M, Cortez-Álvarez CR, Ruiz-Quezada SL, Escutia-Gutiérrez R, García-Lemus CR, et al. In vitro interference by acetaminophen, aspirin, and metamizole in serum measurements of glucose, urea, and creatinine. *Clin Biochem* 2015;48:538-41.
5. Cargnin LP, Hausen BS, Tatsch E, Sangoi MB, Moresco RN. Evaluation of the In Vitro Interference of Hemoglobin, Lipids, and Bilirubin on the Measurement of Plasma Advanced Oxidation Protein Products. *Clin Lab* 2016;62:1585-9.
6. Agarwal S, Vargas G, Nordstrom C, Tam E, Buffone GJ, Devaraj S. Effect of interference from hemolysis, icterus and lipemia on routine pediatric clinical chemistry assays. *Clin Chim Acta* 2015;438:241-5.
7. Wu ZQ, Zhang Y, Xie E, Song WJ, Yang RX, Yan CJ, et al. High uric acid (UA) negatively affects Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) immunoassay. *PLoS One* 2016;11:e0147554.
8. Chinh NH. Mechanism of interference by uric acid in the glucose oxidase-peroxidase method for serum glucose. *Clin Chem* 1974;20:499-501.

9. Du L, Ma J, Zhang X. Higher serum uric acid may contribute to cerebral infarction in patients with type 2 Diabetes Mellitus: A meta-analysis. *J Mol Neurosci* 2017;61:25-31.
10. Causevic A, Semiz S, Macic Dzankovic A, Cico B, Dujic T, Malenica M, et al. Relevance of uric acid in progression of type 2 diabetes mellitus. *Bosn J Basic Med Sci* 2010;10:54-9.
11. Ikeda K, Ichihara K, Hashiguchi T, Hidaka Y, Kang D, Maekawa M, et al. Evaluation of the short-term stability of specimens for clinical laboratory testing. *Biopreserv Biobank* 2015;13:135-43.
12. Bollick YS, de Carvalho JA, Tatsch E, Hausen BS, Moresco RN. Reference limits of the urinary gamma-glutamyltransferase in a healthy population and effects of short-term storage on the enzyme activity. *Clin Chim Acta* 2018;482:46-9.
13. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. *Biochem Med (Zagreb)* 2013;23:70-7.
14. Niazpour F, Bandarian F, Nasli-Esfahani E, Ebrahimi R, Abdollahi M, Razi F. The Effect of Blood Sample Storage Conditions on HbA1c Concentration. *Clin Lab* 2019;65(7).
15. Bergmann K, Sypniewska G. The influence of sample freezing at - 80 °C for 2-12 weeks on glycated haemoglobin (HbA_{1c}) concentration assayed by HPLC method on Bio-Rad D-10[®] auto analyzer. *Biochem Med (Zagreb)* 2016;26:346-52.
16. Koskinen P, Irjala K. Stability of serum fructosamine during storage. *Clin Chem* 1988;34:2545-6.
17. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 1972;18:499-502.

18. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF 3rd, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med* 2009;150:604-12. Erratum in: *Ann Intern Med* 2011;155:408.
19. Baker JR, Metcalf PA, Johnson RN, Newman D, Rietz P. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin Chem* 1985;31:1550-4.
20. Chung HF, Lees H, Gutman SI. Effect of nitroblue tetrazolium concentration on the fructosamine assay for quantifying glycosylated protein. *Clin Chem* 1988;34:2106-11.
21. Taylor EC, Sethi B. Stability of 27 biochemistry analytes in storage at a range of temperatures after centrifugation. *Br J Biomed Sci* 2011;68:147-57.
22. Perry JN, Jasim A, Hojat A, Yong WH. Procurement, Storage, and Use of Blood in Biobanks. *Methods Mol Biol* 2019;1897:89-97.
23. Johnson RN, Metcalf PA, Baker JR. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta* 1982;127:87-95.
24. Kruse-Jarres JD, Jarausch J, Lehmann P, Vogt BW, Rietz P. A new colorimetric method for the determination of fructosamine. *Lab Med* 1989;13:245-53.
25. Schleicher ED, Vogt BW. Standardization of serum fructosamine assays. *Clin Chem* 1990;36:136-9.
26. Labtest Diagnóstica. Fructosamine. Available at: https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/12/Ref_97_EdicMaio1995_RevJulho2017_Ref260519_Eng.pdf. Accessed: 28 Apr 2020.
27. Hoelzel W, Weykamp C, Jeppsson JO, Miedema K, Barr JR, Goodall I, et al. IFCC reference system for measurement of hemoglobin A1c in human blood and the

national standardization schemes in the United States, Japan, and Sweden: a method-comparison study. *Clin Chem* 2004;50:166-74.

28. Bio-Rad D-10[®] Hemoglobin A1c Program Instruction Manual [Online]. Available from: <https://www.mdkhospital.com/documents/Hemoglobin%20A1c%20D10.pdf> [Accessed 2 Jun 2020].
29. English E, Lenters-Westra E. HbA1c method performance: The great success story of global standardization. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2018;55:408-19.
30. Pasella S, Baralla A, Canu E, Pinna S, Vaupel J, Deiana M, et al. Pre-analytical stability of the plasma proteomes based on the storage temperature. *Proteome Sci* 2013 Mar 21;11:e10
31. Lee DH, Kim JW, Jeon SY, Park BK, Han BG. Proteomic analysis of the effect of storage temperature on human serum. *Ann Clin Lab Sci* 2010;40:61-70.

Table 1. Baseline characteristics and biochemical parameters of the study subjects.

Variables	Values
Age (y)	42.3 ± 11.9
Gender male (%)	50.0
BMI (kg/m ²)	29.1 ± 6.1
Fasting glucose (mmol/L)	6.5 (4.7–6.9)
Uric acid (mmol/L)	0.22 ± 0.08
AST (U/L)	23 (19–34)
ALT (U/L)	24 (16–34)
Total cholesterol (mmol/L)	5.7 ± 1.0
LDL cholesterol (mmol/L)	3.2 ± 1.0
HDL cholesterol (mmol/L)	1.5 ± 0.4
Triglycerides (mmol/L)	2.1 (1.2–2.9)
Creatinine (μmol/L)	93.7 (78.7–103.4)
eGFR (mL/min/1.73 m ²)	86.1 ± 26.9

Data are expressed as mean ± SD or medians and interquartile range. AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; BMI, body mass index; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

Table 2. Serum fructosamine concentrations ($\mu\text{mol/L}$) obtained in samples stored at 4°C , -20°C and -80°C for up to 28 days.

	Days						P
	Basal	1	7	14	21	28	
4°C	276 ± 61	224 ± 46	269 ± 54	220 ± 43	255 ± 59	223 ± 53	< 0.001
-20°C	276 ± 61	227 ± 47	265 ± 50	217 ± 41	238 ± 46	203 ± 40	< 0.001
-80°C	276 ± 61	225 ± 46	272 ± 52	222 ± 45	249 ± 49	209 ± 40	< 0.001

The values are expressed as mean \pm SD.

Table 3. Effects of freeze-thaw cycles on serum fructosamine concentrations ($\mu\text{mol/L}$) in samples stored at -20°C and -80°C .

	Basal	Cycle 1	Cycle 2	Cycle 3	P
-20°C	276 ± 61	288 ± 64	285 ± 65	291 ± 68	0.006
-80°C	276 ± 61	287 ± 66	283 ± 66	288 ± 70	0.007

The results are expressed as mean \pm SD. The values obtained in each cycle were compared to the original fructosamine values obtained in fresh serum samples.

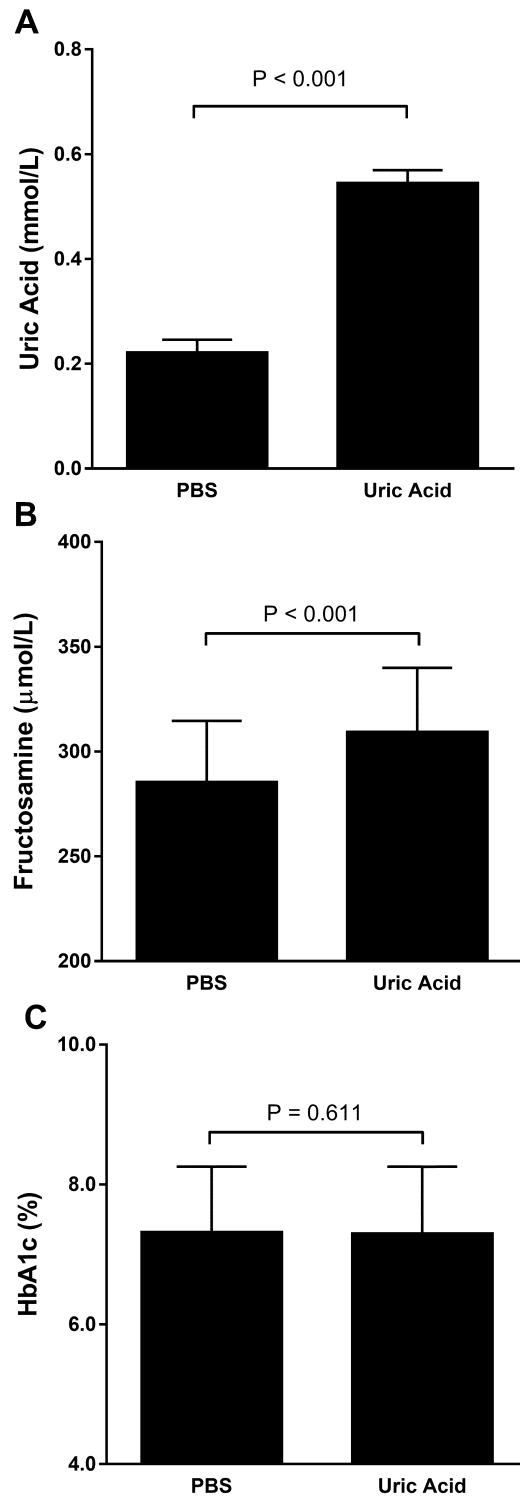


Figure 1. Effect of uric acid on fructosamine and HbA1c concentrations in samples spiked with PBS buffer or uric acid standard solution. Uric acid (A) and fructosamine (B) were evaluated in serum samples and HbA1c (C) in the whole blood. The results are expressed as mean and SEM.

6 CONCLUSÕES

✓ A adição de ácido úrico em elevadas concentrações às amostras provocou um aumento significativo na concentração de frutossamina, enquanto que os níveis de HbA1c não foram alterados. Dessa forma, é possível estimar que indivíduos hiperuricêmicos possam apresentar valores superestimados de frutossamina, o que pode resultar em uma avaliação inadequada do controle glicêmico. Nessa população, a utilização da HbA1c seria ainda mais indicada, uma vez que a mesma não sofreu interferência das altas concentrações de ácido úrico.

✓ O armazenamento das amostras de soro, assim como o *stress* térmico causado pelos ciclos de congelamento/descongelamento resultaram em alterações significativas nos valores de frutossamina. Diante disso, sugere-se que a quantificação do analito deva ser realizada preferencialmente em amostras frescas recém-colhidas.

✓ Nossos achados apontam para a importância de estudos envolvendo variáveis que compõem as fases analíticas, contribuindo assim para garantir a representatividade da amostra e a confiabilidade de seus resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of medical care in diabetes - 2020. **Diabetes Care**, v. 43, supplement 1, 2020.

ANGUIZOLA, J. et al. Glycation of human serum albumin. **Clinical Chimica Acta**, v. 425, p. 64-76, 2013.

BAKER, J. R. et al. Use of protein-based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. **Clinical Chemistry**, v. 31, p. 1550-1554, 1985.

BENN, C. L. et al. Physiology of hyperuricemia and urate-lowering treatments. **Frontiers in Medicine (Lausanne)**, v. 5, a60, 2018.

BERGMANN, K.; SYPNIEWSKA, G. The influence of sample freezing at - 80°C for 2-12 weeks on glycated haemoglobin (HbA_{1c}) concentration assayed by HPLC method on Bio-Rad D-10[®] auto analyzer. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 26, p. 346-352, 2016.

BOWEN, R.A.; REMALEY, A.T. Interferences from blood collection tube components on clinical chemistry assays. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 24, p. 31-44, 2014.

BRINC, D. et al. Long-term stability of biochemical markers in pediatric serum specimens stored at -80 °C: a CALIPER Substudy. **Clinical Biochemistry**, v. 45, p. 816-826, 2012.

BUNN, H. F. et al. The biosynthesis of human hemoglobin A_{1c}. Slow glycosylation of hemoglobin in vivo. **Journal of Clinical Investigation**, v. 57, p. 1652-1659, 1976.

CARGNIN, L.P. et al. Evaluation of the In Vitro Interference of Hemoglobin, Lipids, and Bilirubin on the Measurement of Plasma Advanced Oxidation Protein Products. **Clinical Laboratory**, v. 62, p. 1585-1589, 2016.

CARRARO, P.; PLEBANI, M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. **Clinical Chemistry**, v. 53, p. 1338-1342, 2007.

CAUSEVIC, A. et al. Relevance of uric Acid in progression of type 2 diabetes mellitus. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 10, p. 54-59, 2010.

CHAUDHURI, J. et al. The Role of Advanced Glycation End Products in Aging and Metabolic Diseases: Bridging Association and Causality. **Cell Metabolism**, v. 28, p. 337-352, 2018.

CHINH, N.H. Mechanism of interference by uric acid in the glucose oxidase-peroxidase method for serum glucose. **Clinical Chemistry**, v. 20, p. 499-501, 1974.

CHUNG, H.; LEES, H.; GUTMAN, S.I. Effect of nitroblue tetrazolium concentration on the fructosamine assay for quantifying glycated protein. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 2106-2111, 1988.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline-Third Edition.** CLSI/NCCLS document H18-A3, v. 24, n. 38 (Replaces H18-A2, v. 19, n. 21). Wayne, PA USA: NCCLS, 2004.

CUHADAR, S. et al. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. **Biochemia Medica (Zagreb)**, v. 23, p. 70-77, 2013.

DANESE, E. et al. Advantages and Pitfalls of Fructosamine and Glycated Albumin in the Diagnosis and Treatment of Diabetes. **Journal of Diabetes Science and Technology**, v. 9, p. 169-176, 2015.

DEN ELZEN, W. P. J. et al. Glucose and total protein: Unacceptable interference on Jaffe creatinine assays in patients. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, p. 185-187, 2018.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL RESEARCH GROUP, et al. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. **New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 977-986, 1993.

DIMESKI, G. Interference testing. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 29, p. 43-48, 2008.

DING, L. et al. Hemoglobin A1c and diagnosis of diabetes. **Journal of Diabetes**, v. 10, p. 365-372, 2018.

DU, L.; MA, J.; ZHANG, X. Higher serum uric acid may contribute to cerebral infarction in patients with type 2 Diabetes Mellitus: A meta-analysis. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 61, p. 25-31, 2017.

ENGLISH, E.; LENTERS-WESTRA, E. HbA1c method performance: The great success story of global Standardization. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, v. 55, p. 408-419, 2018.

FARRELL, C. J. L.; CARTER, A. C. Serum indices: managing assay interference. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 53, p. 527-538, 2016.

FORBES, J. M.; COOPER, M. E. Mechanisms of diabetic complications. **Physiological Reviews**, v. 93, p. 137-188, 2013.

GIARDINE, B. et al. Updates of the HbVar database of human hemoglobin variants and thalassemia mutations. **Nucleic Acids Research**, v. 42, p. 1063-1069, 2014.

GISLEFOSS, R.E. et al. Effect of multiple freeze-thaw cycles on selected biochemical serum components. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 55, p. 967-973, 2017.

GLICK, M. R.; RYDER, W. R.; JACKSON, S. A. Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. **Clinical Chemistry**, v. 32, p. 470-475, 1986.

GÓMEZ RIOJA, R. et al. Laboratory sample stability. Is it possible to define a consensus stability function? An example of five blood magnitudes. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 56, p. 1806-1818, 2018.

GRANKVIST, K. et al. Preanalytical aspects on short- and long-term storage of serum and plasma. **Diagnosis (Berlin)**, v. 6, p. 51-56, 2019.

HAWKINS, R. Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 32, p. 5-16, 2012.

HILLEBRAND, J.J.; HEIJBOER, A.C.; ENDERT, E. Effects of repeated freeze-thaw cycles on endocrine parameters in plasma and serum. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 54, p. 289-292, 2017

IKEDA, K. et al. Evaluation of the short-term stability of specimens for clinical laboratory testing. **Biopreservation and Biobanking**, v. 13, p. 135-143, 2015.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. **IDF Diabetes Atlas**, 8th. Edition, 2017.

JALAL, D. I. et al. Uric acid as a mediator of diabetic nephropathy. **Seminars in Nephrology**, v. 31, p. 459-465, 2011.

JIA, W. Standardising HbA1c-based diabetes diagnosis: opportunities and challenges. **Expert Review of Molecular of Diagnostics**, v. 16, p. 343-355, 2016.

KALLNER, A. Detergent enhances interference of urate in determinations of fructosamine. **Clinical Chemistry**, v. 35, p. 1803-1804, 1989.

KOSKINEN, P.; IRJALA, K. Stability of serum fructosamine during storage. **Clinical Chemistry**, v. 34, p. 2545-2546, 1988.

KROLL, M. H.; ELIN, R. J. Interference with clinical laboratory analyses. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1996-2005, 1994.

KRONE, C.A.; ELY, J.T. Ascorbic acid, glycation, glycohemoglobin and aging. **Medical Hypotheses**, v. 62, p. 275-279, 2004.

LABTEST DIAGNÓSTICA. **Frutosamina**, 2020. Disponível em: <https://quibasa.bioclin.com.br/anexos/INSTRUcoes_FRUTOSAMINA.pdf>. Acesso em: 2 mai. 2020.

LEE, D.H. et al. Proteomic analysis of the effect of storage temperature on human serum. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v. 40, p. 61-70, 2010.

LUNA-ZÁIZAR, H. et al. In vitro interference by acetaminophen, aspirin, and metamizole in serum measurements of glucose, urea, and creatinine. **Clinical Chemistry**, v. 48, p. 538-541, 2015.

MAYO CLINIC, 2019. Disponível em: <<http://www.mayocliniclabs.com>>. Acesso em: 19 mai. 2020.

MONNIER, V.M. Intervention against the Maillard reaction in vivo. **Archives Biochemistry and Biophysics**, v. 419, p. 1-15, 2003.

MONTAGNANA, M. et al. Evaluation of biological variation of glycated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects. **Clinical Chimica Acta**, v. 423, p. 1-4, 2013.

NATIONAL GLYCOHEMOGLOBIN STANDARDIZATION PROGRAM. **HbA1c Assay Interferences**, 2016. Disponível em: <<http://www.ngsp.org/interf.asp>>. Acesso em: 2 mai. 2020.

NETTO, A.P. et al. Atualização sobre hemoglobina glicada (HbA1C) para avaliação do controle glicêmico e para o diagnóstico do diabetes: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 31-48, 2009.

NIAZPOUR, F. et al. The Effect of Blood Sample Storage Conditions on HbA1c Concentration. **Clinical Laboratory**, 2019;65(7):10.7754/Clin.Lab.2019.190114.

OLIVEIRA, C. A.; MENDES, M.E. **Gestão da fase analítica do laboratório: como assegurar a qualidade na prática**. 1ª edição ed. Rio de Janeiro: ControlLab, 2010.
OLIVEIRA, E. P.; BURINI, R. C. High plasma uric acid concentration: causes and consequences. **Diabetology and Metabolic Syndrome**, v. 4, p. 2-7, 2012.

PLEBANI, M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 101-110, 2010.

RADIN, M. S. Pitfalls in hemoglobin A1c measurement: When results may be misleading. **Journal of General Internal Medicine**, v. 29, p. 388-394, 2014.

RAI, A.J. et al. HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. **Proteomics**, v. 5, p. 3262-3277, 2005.

RIBEIRO, R. T.; MACEDO, M. P.; RAPOSO, J. F. HbA1c, Fructosamine, and Glycated Albumin in the Detection of Dysglycaemic Conditions. **Current Diabetes Reviews**, v.12, p. 14-19, 2016.

ROCHE. **Fructosamina**, 1999. Disponível em: <http://biodinamica-Ita.com.br/documentos/bulas_H-902/FRUC.pdf>. Acesso em: 2 mai. 2020.

RUMLEY, A.G.; PATERSON, J.R. Drug interference in the measurement of serum fructosamine. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 27, p. 384-385, 1990.

SCHIFF, G. D. et al. Diagnostic error in medicine: analysis of 583 physician-reported errors. **Archives of Internal Medicine**, v. 169, 1881-1887, 2009.

SCHLEICHER, E. D.; VOGT, B. W. Standardization of serum fructosamine assays. **Clinical Chemistry**, v. 36, p. 136-139, 1990.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES. Aspectos técnicos e laboratoriais de diagnóstico e acompanhamento do diabetes *mellitus*. In: **Diretrizes Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD)**. Clannad, 2019-2020. Parte 1, p. 29-31.

TAGHAVI, F. et al. The status of glycation in protein aggregation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 100, p. 67-74, 2017.

UNITED KINGDOM PROSPECTIVE DIABETES STUDY. 13: Relative efficacy of randomly allocated diet, sulphonylurea, insulin, or metformin in patients with newly diagnosed non-insulin dependent diabetes followed for three years. **BMJ**, v. 310, p. 83-88, 1995.

VASCONCELLOS, L. S. Sistematização para estudo de interferentes na avaliação de um método laboratorial bioquímico. In: ANDRIOLO, A. et al. **Recomendações da sociedade brasileira de patologia clínica/medicina laboratorial (SBPC/ML): fatores pré-analíticos e interferentes em ensaios laboratoriais**. 1ª edição ed. Barueri, SP: Manole, 2018. cap. 2, p. 21-28.

VON MEYER, A.; CADAMURO, J. The preanalytical phase – a field for improvement. **Diagnosis (Berlin)**, v. 6, p. 1-3, 2019.

WARD, G. et al. The investigation of interferences in immunoassay. **Clinical Biochemistry**, v. 50, p. 1306-1311, 2017.

WEYKAMP, C. HbA1c: a review of analytical and clinical aspects. **Annals of Laboratory Medicine**, v. 33, p. 393-400, 2013.

WU, Z.Q. et al. High uric acid (UA) negatively affects Serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) immunoassay. **PLoS One**,11:e0147554, 2016.