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

Rogério Luciano Klat

IMPACTO DO ARMAZENAMENTO A CURTO PRAZO E DE MÚLTIPLOS CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

Santa Maria, RS
2020

Rogério Luciano Klat

IMPACTO DO ARMAZENAMENTO A CURTO PRAZO E DE MÚLTIPLOS CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

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

Santa Maria, RS
2020

Klat, Rogério Luciano
Impacto do armazenamento a curto prazo e de múltiplos ciclos de congelamento/descongelamento sobre as concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina / Rogério Luciano Klat.- 2020.
40 p.; 30 cm

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

1. Ciclo congelamento/descongelamento 2. Estabilidade 3. Ferro 4. Ferritina 5. Transferrina I. Moresco, Rafael Noal II. 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 LUCIANO KLAT, 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 Luciano Klat

IMPACTO DO ARMAZENAMENTO A CURTO PRAZO E DE MÚLTIPLOS CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

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 07 de Agosto de 2020:

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

Clovis Paniz, Dr. (UFSM)

Luiz Carlos Cichota, Dr. (URI)

Santa Maria, RS
2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que permitiu que a minha vida seguisse nesse rumo, sabendo do propósito de eu ter chegado até aqui, dando força para perseverar a cada dia.

Ao meu orientador, Prof Dr Rafael, pelas orientações, ensinamentos e pelo exemplo de dedicação à pesquisa e ao saber, muito obrigado pela paciência e pelo conhecimento compartilhado.

Aos meus pais, pela educação que recebi, pelo exemplo de luta e abdicação em prol da minha educação e de minha irmã.

À minha esposa Fabiana e filho Lorenzo, que sempre me incentivam a buscar meus objetivos.

Aos colegas do Labiclin, especialmente a Carol e a Mari, obrigado pelo auxílio, companheirismo e amizade.

Aos colegas do Colégio Politécnico que me auxiliaram e substituiram quando necessário nesses dois anos.

À minha banca examinadora, professores Clovis Paniz, Luiz Carlos Cichota, Fernanda Pavani Stamm Maldaner, agradeço a disponibilidade e conhecimento compartilhado.

À Universidade Federal de Santa Maria, pelos anos de experiência e conhecimento e pela possibilidade de executar este trabalho.

A educação não tem preço. Sua falta tem custo.

Antônio Gomes Lacerd

RESUMO

IMPACTO DO ARMAZENAMENTO A CURTO PRAZO E DE MÚLTIPLOS CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO SOBRE AS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

AUTOR: Rogério Luciano Klat
ORIENTADOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

A maioria das alterações nos resultados laboratoriais, apesar de todos os cuidados tomados para eliminá-las ou minimizá-las, ocorre devido a processos relacionados à fase pré-analítica. Essa etapa pode sofrer interferências, tais como: tempo e temperatura de armazenamento das amostras para posterior análise, submissão das amostras a ciclos de congelamento/descongelamento, entre outros, que poderão acarretar em uma redução da estabilidade da amostra a ser analisada. Por ainda não existirem estudos de estabilidade a curto prazo explorando o status do ferro, este estudo tem por objetivo investigar os efeitos de ciclos de congelamento/descongelamento sobre o ferro sérico, transferrina e ferritina, bem como o impacto do armazenamento a curto prazo na estabilidade desses analitos. Amostras de soro de dez voluntários foram submetidas a três ciclos consecutivos de congelamento a -20°C e -80°C e descongelamento a 37°C em um mesmo dia. Alíquotas de soro também foram mantidas a 4°C, -20°C e -80°C por vinte e oito dias. Ferro, ferritina e transferrina foram medidos após um, sete, quatorze, vinte e um ou vinte e oito dias de armazenamento. A ferritina e a transferrina séricas apresentaram variações de -2,6 a 2,6% e -1,7 a 2,4%, respectivamente, em suas concentrações durante os três ciclos de congelamento/descongelamento a -20°C e -80°C, no entanto, as variações foram estatisticamente significantes apenas a -20°C ($P=0,003$ e $P=0,002$, respectivamente). Não foram encontradas alterações significativas para o ferro nas duas temperaturas. O armazenamento nas temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C por até quatro semanas afetou significativamente as concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina ($P<0,01$ para todos). Devido ao fato de que ferro, ferritina e transferrina foram afetados pelo armazenamento de amostras a temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C por até quatro semanas, e os ciclos de congelamento/descongelamento a -20°C influenciaram a medição da ferritina e transferrina no soro, recomenda-se, sempre que possível, que os analitos do status do ferro sejam determinados em amostras frescas.

Palavras-chave: Estabilidade. Ciclo congelamento/descongelamento. Ferro. Ferritina. Transferrina.

ABSTRACT

IMPACT OF SHORT-TERM STORAGE AND MULTIPLE FREEZING / DEFROSTING CYCLES ON SERUM IRON, FERRITINE AND TRANSFERRIN CONCENTRATIONS

AUTHOR: Rogério Luciano Klat
ADVISOR: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Most changes in laboratory results, despite all the care taken to eliminate or minimize them, occur due to processes related to the pre-analytical phase. This stage may suffer interference, such as: time and temperature of storage of the samples for later analysis, submission of the samples to freeze/thaw cycles, among others, which may result in a reduction of the stability of the sample to be analyzed. As there are no short-term stability studies exploring iron status, this study aims to investigate the effects of freezing and thawing cycles on serum iron, transferrin and ferritin, as well as the impact of short-term storage on stability of these analytes. Serum samples from ten volunteers were subjected to three consecutive freezing cycles at -20°C and -80°C and thawing at 37°C on the same day. Serum aliquots were also kept at 4°C, -20°C and -80°C for twenty-eight days. Iron, ferritin and transferrin were measured after one, seven, fourteen, twenty-one or twenty-eight days of storage. Serum ferritin and transferrin varied from -2.6 to 2.6% and -1.7 to 2.4%, respectively, in their concentrations during the three freezing and thawing cycles at -20°C and -80°C, however, the variations were statistically significant only at -20°C ($P=0.003$ and $P=0.002$, respectively). No significant changes were found for iron at both temperatures. Storage at 4°C, -20°C and -80°C for up to four weeks significantly affected serum iron, ferritin and transferrin concentrations ($P<0.01$ for all). Due to the fact that iron, ferritin and transferrin were affected by the storage of samples at temperatures of 4°C, -20°C and -80°C for up to four weeks, and the freezing and thawing cycles at -20°C influenced the measurement of serum ferritin and transferrin, it is recommended, whenever possible, that iron status analytes be determined in fresh samples.

Keywords: Stability. Freeze / thaw cycle. Iron. Ferritin. Transferrin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 – Mecanismo da homeostase do ferro corporal.....16

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO CIENTÍFICO

Table 1 – Baseline characteristics of the study population…….32
Table 2 – Effects of the freeze/thaw cycles on serum iron, ferritin, and transferrin……..….....…33
Table 3 – Stability of serum iron, ferritin and transferrin in different temperatures up to 28 days….....….....34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
Hb	Hemoglobina
ISO	*International Organization for Standardization*
kDa	Quilodaltons
O_2	Oxigênio molecular
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO 12
2 INTRODUÇÃO 13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 14
3.1 FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA 14
3.2 EFEITOS DO ARMAZENAMENTO SOBRE O FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA 17
3.3 CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO E IMPACTO SOBRE O FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA 20
4 OBJETIVOS 22
4.1 OBJETIVO GERAL 22
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 22
5 MANUSCRITO CIENTÍFICO 23
6 CONCLUSÃO 35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 36
ANEXO A – MANUSCRITO CIENTÍFICO ACEITO 40

1 APRESENTAÇÃO

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS, RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se no **MANUSCRITO CIENTÍFICO**, aceito no periódico *Clinical Laboratory*, e representam a íntegra deste estudo. O item **CONCLUSÕES**, o qual pode ser 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 nos itens **INTRODUÇÃO** e **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** desta dissertação, de modo que as referências utilizadas para a elaboração do manuscrito estão mencionadas no mesmo.

2 INTRODUÇÃO

A busca constante pela excelência nos laboratórios clínicos faz com que cresçam os esforços a fim de anular ou minimizar o impacto causado por interferências, principalmente na etapa pré-analítica. Alguns autores consideram essa etapa a mais sensível ou vulnerável em toda a corrida analítica, sendo que qualquer falha acarretaria perda da confiabilidade e da qualidade dos resultados (NIELSEN et al., 2017; SIMUNDIC; LIPPI, 2012).

Amostras de sangue de boa qualidade são imprescindíveis para que os resultados obtidos sejam confiáveis. A baixa qualidade das amostras, geralmente, está relacionada a falhas ocasionadas na etapa pré-analítica, acarretando resultados imprecisos, que podem chegar a 75% do total de erros laboratoriais (GREEN, 2013; LIPPI et al., 2011).

No presente estudo, optou-se por avaliar aspectos relacionados aos marcadores de *status* do ferro, incluindo o próprio ferro, ferritina e transferrina os quais possuem funções muito importantes no organismo e pelo fato de serem impresceindíveis à vida.

O ferro é imprescindível para a manutenção da homeostase e para um perfeito funcionamento do cérebro (SVOBODOVA et al., 2020), síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e para o transporte de oxigênio (O_2) (BOGDAN et al., 2016). A transferrina, também conhecida por siderofilina, possui como função principal o transporte de íons ferro, que devem estar na forma férrica (BOSHUIZEN et al., 2017; GOMME; MCCANN; BERTOLINI, 2005; LI; QIAN, 2002). A ferritina é responsável pelo armazenamento de ferro e também atua na homeostase (KNOVICH et al., 2009; SVOBODOVA et al., 2020).

Devido à grande relevância e ao pequeno número de estudos relacionados a estabilidade a curto prazo e ciclo congelamento/descongelamento envolvendo o status do ferro, uma investigação se faz necessária sobre alguns fatores pré-analíticos e seus possíveis impactos sobre a estabilidade das amostras frente a exposição a sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento, e também no armazenamento a curto prazo.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

O ferro é um elemento imprescindível à vida, possui funções biológicas variadas, tais como: transporte e armazenamento de O_2, além de atuar em processos catalíticos na síntese de DNA e desempenhar papel na produção de energia (BOGDAN et al., 2016). No entanto, o excesso de ferro livre pode ser prejudicial, uma vez que o excedente pode reagir com O_2 e formar radicais livres tóxicos, os quais atacam as membranas das células, proteínas e inclusive DNA (ANDREWS, 1999). Nos humanos não há excreção de ferro, o que ocorre são perdas, em torno de 1 a 2 mg diário, através da descamação epitelial e também por perda de sangue (WANG; BABITT, 2019).

Além de sua absorção pelas células intestinais, que também são responsáveis pela exportação de ferro para a corrente sanguínea (ANDREWS, 1999), o organismo possui mecanismos que regulam a concentração de ferro. A nível sitêmico se dá através da hepcidina, hormônio de 25 aminoácidos sintetizado no fígado e excretado pelos rins, que atua na homeostase do ferro se ligando à ferroportina, que é internalizada e degradada (WANG; BABITT, 2019). A hepcidina é regulada de acordo com os níveis de ferro, que podem contribuir para um aumento da hepcidina e inibição da ferroportina, com isso limitando a entrada de ferro na corrente sanguínea mantendo seus níveis em equilíbrio (WANG; BABITT, 2019).

No sistema retículo-endotelial estão localizados mais de dois terços de todo o ferro corporal (OGAWA; TSUCHIYA; MAEDA, 2020). A medula óssea é a principal consumidora de ferro, que será utlizado na produção da hemoglobina (Hb) dos glóbulos vermelhos (KNOVICH et al., 2009). No momento do nascimento a quantidade de ferro corporal é de aproximandamente 75 mg/Kg de peso (WIDDOWSON et al., 1988), já em um adulto normal varia de 35-45 mg de ferro/Kg de peso, (LI; QIAN; 2002).

A deficiência de ferro, salvo em casos leves ou moderados, é a maior causa de anemia, afetando uma parcela significativa da população mundial e provocando diversas consequências prejudiciais ao organismo. Além disso, ocorre prejuízo ao desempenho cognitivo, assim como no crescimento, estado imunológico, capacidade física, funções gastrointestinais, produção e metabolismo de hormônios

e durante a gravidez aumenta os riscos perinatais, contudo o excesso de ferro também pode causar danos (WHO; 2001). Alterações nas quantidades armazenadas de ferro poderão ser evidenciadas a partir de testes laboratoriais, tais como: dosagem de Hb, volume corpuscular médio, concentração corpuscular média de Hb, capacidade total de ligação de ferro e saturação de transferrina (WHO; 2001).

A Organização Mundial da Saúde estima que em países em desenvolvimento a anemia acometa 39% das crianças menores de cinco anos, 48% das crianças entre cinco e quatorze anos, 42% de todas as mulheres e 52% das gestantes (WHO; 2001). Adicionalmente, estima-se, também, que aproximadamente 25% de crianças em idade pré-escolar do mundo apresentem anemia por deficiência de ferro (MCLEAN et al., 2009). Nos alimentos existem substâncias que promovem (proteínas da carne, leite humano, ácido ascórbico e ácido cítrico) e outras que inibem (cálcio, polifenóis e leite de vaca) a absorção de ferro (DOMELLÖF, 2007).

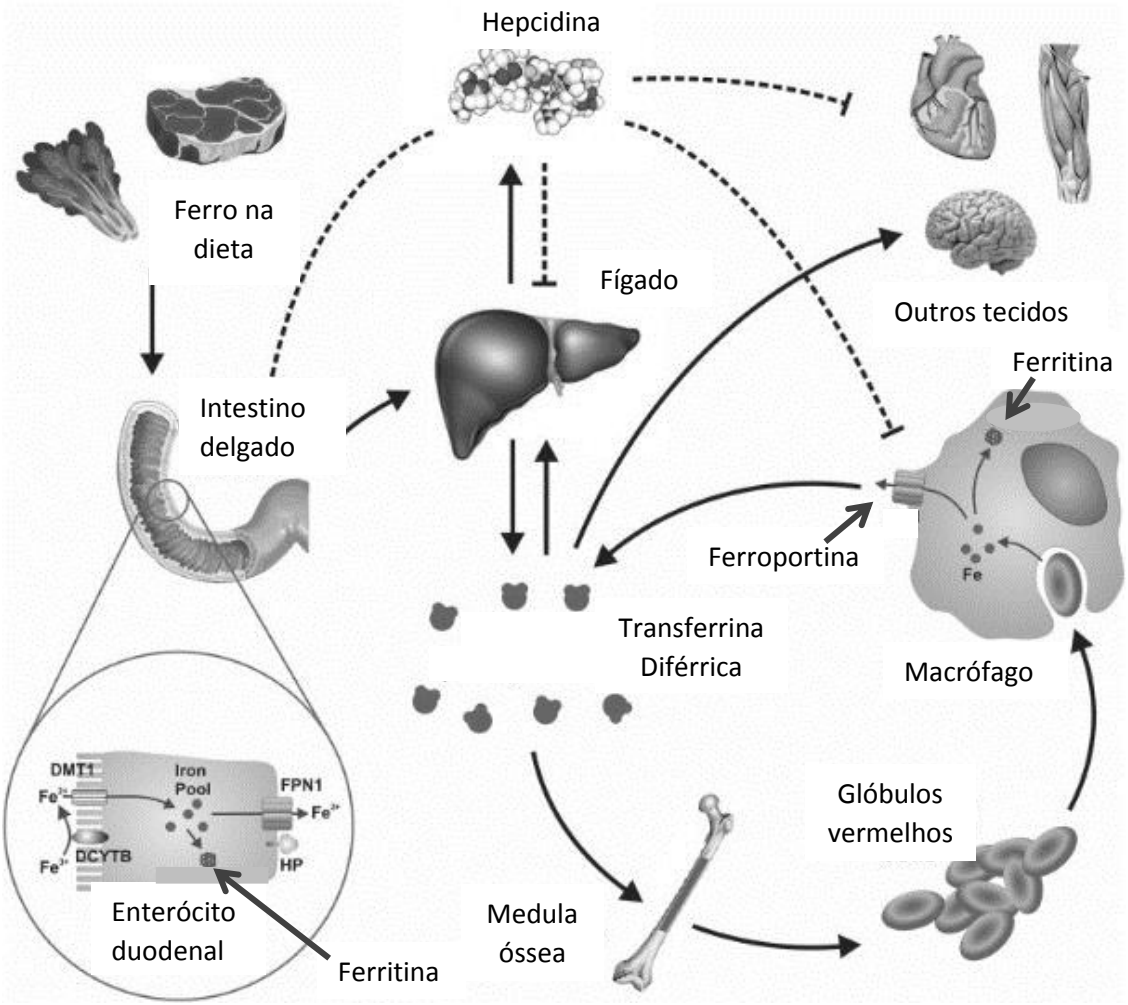
A Figura 1 ilustra um esquema do metabolismo do ferro corporal.

Para determinar a concentração de ferro sérico utiliza-se método colorimétrico, onde o ferro, após ser separado da transferrina, sua proteína transportadora, através da adição de um ácido que tem por objetivo precipitar a proteína, é quantificado pela adição de um cromógeno, resultando numa reação de cor (GROTTO, 2010).

A ferritina é uma proteína de 460 kDa cuja função principal é armazenar e disponibilizar ferro, e apresenta propriedades enzimáticas convertendo o ferro da forma ferrosa para a forma férrica (FINCH et al., 1986; TORTI, F.; TORTI, S., 2002). Quando há uma alteração desta, observa-se um desequilíbrio na homeostase ou no metabolismo do ferro (KNOVICH et al., 2009). Ela geralmente apresenta concentrações séricas elevadas em doenças malignas, e em diversas condições inflamatórias e neurovegetativas (KNOVICH et al., 2009).

A ferritina sérica é utilizada em conjunto com outros analitos na mensuração do status do ferro, sendo considerada uma ferramenta diagnóstica muito útil na diferenciação das anemias causadas por deficiência de ferro das demais, além de ser considerada a melhor maneira para quantificar o estoque de ferro corporal (KNOVICH et al., 2009). No entanto, o diagnóstico de excesso de ferro depende da exclusão de outras condições que podem ocasionar um aumento na concentração da ferritina plasmática, tais como: inflamação, dano tecidual, aumento no metabolismo e neoplasias (FINCH et al., 1986).

Figura 1. Mecanismo da homeostase do ferro corporal.



O ferro proveniente da dieta é absorvido, a ferritina armazena e disponibiliza o ferro, que se liga à transferrina e é distribuído aos tecidos corporais. Os eritrócitos envelhecidos são fagocitados por macrófagos, o ferro é liberado da hemoglobina e entra novamente na circulação (GREGORY; DAVID, 2017). O mecanismo de homeostase sistêmica do ferro é regulado pela hepcidina, hormônio sintetizado no fígado, que atua se ligando à ferroportina, induzindo a sua internalização e degradação em vários tipos de células (BOGDAN et al., 2016).

Fonte: Adaptado de GREGORY; DAVID, 2017.

Além do método imunoturbidimétrico, a ferritina sérica pode ser determinada através de métodos imunoenzimáticos, utilizando anticorpos antiferritina humana, através de técnicas de Ensaio de Imunoabsorção Enzimática (ELISA) ou eletroquimioluminescência (COOK; BAYNES; SKIKNE, 1992).

A transferrina, também conhecida por siderofilina, é uma glicoproteína sintetizada principalmente nos hepatócitos (BOSHUIZEN et al., 2017; GOMME; MCCANN; BERTOLINI, 2005; GRUSZEWSKA et al., 2017). Possui uma massa

molecular de 79,6 quilodaltons (kDa), é constituída por três subdomínios estruturais, sendo duas cadeias de oligossacarídeos N-ligadas e uma única cadeia polipeptídica composta por 679 aminoácidos (DE JONG; VAN DIJK; VAN EIJK, 1990). Além disso, a transferrina possui nove isoformas, de acordo com o número de resíduos de ácido siálico nas cadeias de carboidratos, da asialotransferrina à octasialotransferrina (GRUSZEWSKA et al., 2017).

A principal função da transferrina é transportar ferro para os tecidos que necessitam desse metal essencial em diferentes processos fisiológicos (PAPANIKOLAOU; PANTOPOULOS, 2005). No soro humano, em condições normais, cerca de um terço da concentração de transferrina é saturada com ferro, fornecendo uma capacidade de armazenamento eficiente em caso de aumento dos níveis de ferro no sangue (RHOADES; BELL, 2017), uma vez que uma molécula de transferrina pode se ligar a até dois íons ferro na forma férrica (CHUNG, 1984).

A transferrina é um biomarcador bem estabelecido em diferentes patologias humanas. A determinação de transferrina sérica tem importância clínica conhecida em casos de pacientes com deficiência de ferro, como na avaliação diagnóstica de anemia, na qual a transferrina apresenta-se aumentada, porém menos saturada (MOTTA, 2009). Os níveis de transferrina no sangue estão associados a estados de sobrecarga de ferro que ocorrem em doenças como hemocromatose hereditária, hipotransferremia, atransferrinemia, siderose transfusional e distúrbios associados à ferroportina (ALEXANDER; KOWDLEY, 2009). Adicionamente, a concentração de transferrina sérica diminui nos processos inflamatórios, desnutrição, tumores malígnos, neoplasias, hemólise e deficiências hereditárias (MOTTA, 2009).

A determinação da transferrina pode ser realizada por imunoturbidimetria, radioimunoensaio, nefelometria e ELISA. Atualmente os métodos utilizados para quantificação da transferrina sérica, devido à maior precisão, são os imunoquímicos, entre os quais se incluem imunoturbidimetria e imunonefelometria (BURTIS, 2008).

3.2 EFEITOS DO ARMAZENAMENTO SOBRE O FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

É prática bastante comum em laboratórios, principalmente em ambiente hospitalar, o armazenamento de amostras a fim de evitar coletas desnecessárias, tornando mais rápida determinação de um analito adicional. Além disso, esse

armazenamento também tem o objetivo de, caso necessário, realizar a confirmação de algum resultado nessa amostra (NIELSEN et al., 2017).

Amostras biológicas mantidas à temperatura ambiente sofrem transformações químicas, enzimáticas e bacterianas. Sendo assim, é preferível analisar amostras frescas. Quando necessário opta-se por, na tentativa de manter a integridade e assegurar a estabilidade, armazenar as amostras a temperaturas que variam de 4°C a -142°C. No entanto, as condições mais utilizadas são: 4°C (refrigeração) e -5°C a -20°C (congelador) (SUBRAMANIAN, 1995).

Dentro do processo da análise laboratorial, a estabilidade faz parte da etapa pré-analítica, responsável por grande parte dos erros nas determinações laboratoriais, que podem ser devido à perda de qualidade da amostra, principalmente pelo armazenamento inapropriado (GREEN, 2013; LIPPI et al., 2011), tornando imprescindível o aperfeiçoamento de condições de armazenamento e tratamento das amostras nessa etapa.

A estabilidade pode ser considerada como a capacidade que a amostra armazenada possui de reproduzir o valor determinado da concentração a partir da linha de base com uma variação aceitável, nas mesmas condições (GUDER et al., 2003), ou, conforme definada pela *International Organization for Standardization* (ISO), é a capacidade que a amostra possui de manter um valor de propriedade inicial dentro de limites especificados, por um período especificado e armazenado sob condições definidas (ISO Guide 30, 2015). Alguns fatores podem levar à sua alteração, tais como: tempo, temperatura na qual a amostra é armazenada e também quando submetida a ciclos de congelamento/descongelamento (NIELSEN et al., 2017).

O analito ferro, quando armazenado a partir de dez horas a 21°C, parece ser impactado de forma bastante significativa, chegando a um aumento médio de 11% em relação à medição basal (HENRIKSEN et al., 2014). Também se mostrou instável por menos de vinte e quatro horas a 25°C e a 35°C, demonstrando um aumento significativo (TANNER et al., 2008). Por outro lado, a temperaturas negativas, alguns estudos indicaram boa estabilidade desse analito por até quatro meses, quando o armazenamento foi a temperatura de -20°C (DONNELLY et al., 1995) e por até doze meses quando armazenado a temperaturas de -20, -70 e -196°C (JANSEN; BEEKHOF; SCHENK, 2013). No entanto, nesse estudo, foram observadas algumas variações que resultaram em um aumento significativo dos

valores em relação ao valor inicial, nas amostras armazenadas a temperatura de -70°C e na determinação dos seis meses (JANSEN; BEEKHOF; SCHENK, 2013).

Existe escassez de informação a respeito da estabilidade da ferritina a curto prazo quando o armazenamento é realizado em temperaturas negativas. Em um estudo realizado avaliando a estabilidade a temperatura ambiente, a 4°C e -6°C, a ferritina não demonstrou variação fora do aceitável por até quatorze dias (KUBASIK et al., 1982). Outro estudo demonstrou a falta de capacidade da ferritina em se manter estável, onde houve aumento dos valores quando o armazenamento foi por vinte e quatro horas a 25°C e já aumentaram após quatro horas de armazenamento a 35°C, excedendo o limite clinicamente aceitável (TANNER et al., 2008). No entanto, um estudo mais recente, onde as amostras foram armazenadas a 21°C por dez horas, o resultado foi diferente, apresentou uma diminuição em relação à dosagem basal que, apesar de ser quantitativamente pequena, foi significativa (HENRIKSEN et al., 2014).

A ferritina é suscetível à degradação quando armazenada por um longo período, sofrendo decréscimo de 18,5% ao longo de vinte e cinco anos de armazenamento a -25°C em comparação com os valores médios obtidos das amostras frescas (GISLEFOSS; GRIMSRUD; MORKRID, 2009). Já em publicação recente, os resultados obtidos evidenciaram a estabilidade da ferritina sérica após armazenamento a longo prazo, por até cinco anos a -80°C, pois as diferenças médias das variações estavam dentro do limite aceitável (SACRI et al., 2017).

A transferrina conseguiu apresentar uma boa estabilidade ao longo do período de um ano nas temperaturas de -20, -70, e -196°C, apesar de variações iniciais (JANSEN; BEEKHOF; SCHENK, 2013). Em contraste, outro estudo no qual a avaliação foi de até vinte e cinco anos e armazenamento a -25°C demonstrou que a transferrina não apresenta uma boa estabilidade. Ao comparar a determinação após dois anos ao período inicial, houve um decréscimo de 3,4% na sua concentração. Quando a avaliação foi da concentração de vinte e cinco anos comparada à inicial houve um acréscimo de 8,2%, e a diferença tornou-se mais evidente quando a comparação foi realizada entre os valores das dosagens de dois anos e de vinte e cinco anos, que apresentou um acréscimo de 12,1% (GISLEFOSS; GRIMSRUD; MORKRID, 2009).

3.3 CICLOS DE CONGELAMENTO/DESCONGELAMENTO E IMPACTO SOBRE O FERRO, FERRITINA E TRANSFERRINA

A análise do ciclo congelamento/descongelamento consiste em congelar as amostras à temperatura indicada, mantidas por um determinado período, sendo então submetidas ao descongelamento à temperatura ambiente. Após as amostras estarem completamente descongeladas, inicia-se um novo ciclo, seguindo as mesmas condições de congelamento, manutenção e descongelamento, quantificando o analito nas amostras após o último ciclo. O objetivo desse teste é verificar se ocorre uma alteração na concentração do analito após a entrada e saída das amostras nos congeladores durante o armazenamento (VIEIRA; REDIGUIERI, Camila; REDIGUIERI, Carolina, 2013).

Pouco interesse havia sobre os efeitos provocados por repetidos ciclos de congelamento/descongelamento nas concentrações de vários analitos no soro ou plasma até o crescimento dos bancos de soro e plasma durante a última parte do século XX. Embora possam ser minimizados os efeitos de congelamento e descongelamento repetidos de amostras com o armazenamento em vários recipientes pequenos, algumas vezes, por necessidade, é utilizado soro ou plasma que já foi exposto a um ou mais ciclos de congelamento/descongelamento, levando a questionamentos sobre os dados obtidos a partir dessas amostras (COMSTOCK et al., 2008).

Várias tensões podem ser induzidas pelo congelamento da amostra, como temperatura baixa, cristalização da água e formação de gelo, concentração do soluto e alterações no pH (CAO et al., 2003), o que contribui para a desnaturação de proteínas (FRANKS, 1985). O impacto do congelamento/descongelamento sobre os níveis de lipoproteínas, no qual amostras de soro foram congeladas a -20 e -70°C e posteriormente descongeladas a temperatura ambiente em ciclos que se estenderam por um mês, demonstrou variação significativa negativa em relação às amostras frescas (SGOUTAS; TUTEN, 1992). Sendo assim, tornou-se necessário estudar maneiras de minimizar os danos provocados pela operação de ciclo congelamento/descongelamento (JIANG; NAIL, 1998).

Os efeitos de um descongelamento intermediário, vinte e quatro horas após o congelamento inicial, foram desfavoráveis à estabilidade da ferritina quando armazenada por até cinco anos a -80°C, causando elevações nos resultados quando

comparados às amostras que não sofreram esse descongelamento. Já em um curto período de armazenamento (sete dias) as variações observadas não foram clinicamente significativas, independentemente das amostras terem sofrido descongelamento intermediário ou não (SACRI et al., 2017). Resultado diferente foi relatado em outro estudo, no qual não foi observada variação significativa nas medidas de ferritina sérica mantida a -80°C por até treze meses submetendo-as a um ciclo de congelamento/descongelamento mensal (BRINC et al., 2012).

A transferrina, quando submetida a seis ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento que se estenderam por até quarenta e três dias, demonstrou não sofrer impacto (STODDARD et al., 1984). No entanto, não ficou claro quais os critérios para escolha dos dias para efetuar as avaliações. Dessa forma, faz-se necessária a avaliação mais aprofundada dos impactos provocados por sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento sobre este analito.

Apesar das evidências já existentes em relação à estabilidade do ferro, ferritina e transferrina e ao comportamento desses analitos frente a ciclos de congelamento/descongelamento, as informações são conflitantes e, em alguns casos, defasadas. Considerando a falta de informações consistentes sobre os efeitos de sucessivos ciclos de congelamento/descongelamento, princialmente do analito ferro, e a escassez de estudos sobre a estabilidade a curto prazo, é necessário explorar mais sobre o comportamento dos analitos nessas situações.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do armazenamento a curto prazo e de três ciclos consecutivos de congelamento/descongelamento sobre as concentrações séricas de ferro, ferritina e transferrina.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos do armazenamento de amostras de soro humano a 4°C, -20°C e -80°C, por um período de até vinte e oito dias, sobre a estabilidade do ferro, ferritina e transferrina;
- Verificar os efeitos de três ciclos consecutivos de congelamento/descongelamento nas temperaturas de -20°C e -80°C sobre os analitos de escolha;
- Identificar a melhor condição de armazenamento das amostras de soro para a quantificação do ferro, ferritina e transferrina.

5 MANUSCRITO CIENTÍFICO

Effects of the freeze-thaw cycles and assessment of short-term stability on serum iron, ferritin, and transferrin

Rogério L. Klat[1], Carolina dos S. Stein[1], Mariane dos Santos[1], Rafael N. Moresco[1]*.

Aceito no periódico *Clinical Laboratory*

Effects of the freeze-thaw cycles and assessment of short-term stability on serum iron, ferritin, and transferrin

Running title: Stability of serum iron, ferritin, and transferrin

Rogério L. Klat[1], Carolina dos S. Stein[1], Mariane dos Santos[1], Rafael N. Moresco[1*]

[1]Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, 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, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.
Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018
E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Funding
R. N. Moresco is a recipient of a research productivity scholarship from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq, Brazil, number 309799/2017-1).

Declaration of Interest
There are no conflicts of interest to declare.

SUMMARY

Background: Most errors in the laboratory occur due to processes related to the pre-analytical phase. The purpose of this was to investigate the effects of multiple freeze-thaw cycles on serum iron, transferrin, and ferritin, as well as the impact of short-term storage on the stability of these analytes.

Methods: Serum samples from ten volunteers were submitted to three consecutive freeze-thaw cycles at -20°C and -80°C. Serum aliquots were also kept at 4°C, -20°C, and -80°C for 28 days. Iron, ferritin, and transferrin were measured after 1, 7, 14, 21, or 28 days of storage.

Results: Serum ferritin and transferrin showed variations from -2.6 to 2.6% for ferritin and -1.7 to 2.4%, respectively, in their concentrations during the three freeze-thaw cycles of -20°C and -80°C. However, the variations were statistically significant only at -20°C. No significant changes were found for iron at both temperatures. The storage at temperatures of 4°C, -20°C, and -80°C for up to 4 weeks significantly affected the serum concentrations of iron, ferritin, and transferrin ($p < 0.01$ for all).

Conclusions: Serum iron, ferritin, and transferrin were affected by the storage of samples at temperatures of 4°C, -20°C and -80°C for up to 4 weeks, and the freeze-thaw cycles at -20°C influenced the measurement of serum ferritin and transferrin.

Keywords: Iron, Ferritin, Freeze-thaw cycle, Stability, Transferrin.

INTRODUCTION

The assessment of pre-analytical interference on laboratory tests is of great importance, since this step is considered the most sensitive phase of the entire analytical process, and must guarantee quality and reliability [1, 2, 3]. Errors in the pre-analytical phase are responsible for up to 75% of laboratory exam errors [1, 4]. Therefore, it is of interest to investigate some aspects of the influence of freeze-thaw cycles and short-term storage on the stability of laboratory parameters such as iron, ferritin, and transferrin.

More than two-thirds of the iron present in the body is located in the reticuloendothelial system, encompassing hemoglobin, and bone marrow [5]. Iron is essential for the transport of oxygen, DNA synthesis, and homeostasis maintenance [6, 7]. Transferrin is synthesized mainly in liver hepatocytes [8, 9, 10], and it is essential to transport iron ions in the ferric form [9, 10, 11]. Ferritin is another protein that acts on homeostasis, and in iron storage [7, 12]. Besides, this protein is useful to differentiate anemia caused by iron deficiency from other types of anemia, as well as to quantify the iron content stored in the body [12].

Evidence related to the assessment of the stability of iron, ferritin, and transferrin is mainly focused on long-term storage [13, 14, 15]. For this reason, it is important to investigate the stability of these analytes under other conditions. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of multiple freeze-thaw cycles on serum iron, transferrin, and ferritin, as well as the impact of short-term storage on the stability of these analytes.

MATERIALS AND METHODS

Study population

Ten supposedly healthy subjects were enrolled at the University Hospital of Santa Maria, located in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. None of the individuals recruited had urinary tract diseases, previous kidney disease, undergoing kidney transplantation, inflammatory or infectious diseases, neoplasms, liver disease, and thyroid disorders. Blood samples were collected via the venous puncture technique into Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes without anticoagulant, after at least 8 hours fasting period. After, the samples were centrifuged at 2500 × g for 15 minutes. The serum was used to measure the analytes. The samples were aliquoted and stored under the necessary conditions for the assays. The local Research Ethics Committee approved this study (number 11559119.4.0000.5346), and all participants signed a consent form.

Laboratory measurements

Dosages were performed via the BS 380® automated biochemical analyzer (Mindray, Shenzhen, China) using commercial kits (Bioclin®, Belo Horizonte, Brazil). Baseline fasting glucose, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), total cholesterol, HDL-cholesterol, and triglycerides were quantified by use of commercial assays. The body mass index (BMI) was calculated by dividing the weight in kilograms by the square of the height in meters. Iron was determined by a colorimetric technique using the modified Goodwin/Ferrozine methodology, in which the iron is released from transferrin in acidic medium and reduced to the ferrous state through hydroxylamine and then reacts with ferrozine leading to the formation of a violet complex. Transferrin and ferritin were determined by immunoturbidimetric assays, where the analytes react with specific antibodies forming an antigen-antibody complex. The turbidity was proportional to the concentration of the analyte in the sample.

Effects of freeze-thaw cycles on serum analytes

Serum samples were kept at -20°C and -80°C. Every 75 minutes, the samples were thawed for 15 minutes at 37°C, and the levels of iron, ferritin, and transferrin were measured. Then, the samples were refrozen, and a new cycle began. Three consecutive cycles were performed on the same day as the blood collection.

Stability of iron, transferrin and ferritin at 4°C, −20°C and −80°C

For this investigation, 15 aliquots were taken from each sample, of which five tubes were kept in each temperature: 4°C, -20°C, and -80°C. After 1, 7, 14, 21, or 28 days of storage, one tube from each individual was thawed at 37°C for 15 minutes, and the analytes were measured.

Statistical Analysis

The distribution of the variables was investigated by the use of the D'Agostino and Pearson omnibus normality test. The parametric variables were expressed as mean ± standard deviation (SD) and the non-parametric as median and interquartile range. The one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures was used to verify the influence of storage conditions on analyte stability. A p-value of less than 0.05 was considered statistically significant. Data were analyzed using GraphPad Prism® software version 6.01 (GraphPad Software, La Jolla, California, USA).

RESULTS

The baseline characteristics of the study population are shown in Table 1. The effects of the freeze-thaw cycles on the serum iron, ferritin, and transferrin were reported in Table 2. Serum iron presented a reduction between 3.4% and 11.2% along with the three freeze-thaw cycles compared to the baseline values at the temperatures of -20°C and -80°C. The highest variations were observed in the samples kept at -80°C; however, the differences were not statistically significant for both temperatures ($p = 0.239$ and $p = 0.088$, respectively). Serum ferritin and transferrin showed variations in their concentrations during the three freeze-thaw cycles at temperature of -20°C and -80°C. The values varied from -2.6 to 2.6% for ferritin and from -1.7 to 2.4% for transferrin over all three cycles. However, the variations were statistically significant for ferritin and transferrin only in samples maintained at -20°C ($p = 0.003$ and $p = 0.002$, respectively).

The storage of serum samples at temperatures of 4°C, -20°C, and -80°C for up to 4 weeks significantly affected the serum concentrations of iron, ferritin, and transferrin (Table 3). Iron showed a variation of -12.3 to 29.2% concerning its basal value found in fresh samples, and the most prominent variations were found in samples stored at 4°C ($p < 0.001$). Besides, the storage at all temperatures significantly affected ($p < 0.001$) the concentrations of ferritin and transferrin, with variations ranging from -6.0 to 58.1% and from -22.3 to -3.5%, respectively.

DISCUSSION

This study demonstrated that freeze-thaw cycles at -20°C affected the measurement of serum ferritin and transferrin. Besides, the stability of serum iron, ferritin, and transferrin was affected by the three storage temperatures at times investigated in the present study. Although the stability of these analytes was previously investigated [3, 13, 14, 16], the importance of the present study is to provide a better understanding of short-term stability of serum iron, ferritin, and transferrin, as well as the impact of three consecutive freeze-thaw cycles on these analytes in other conditions.

The successive freeze-thaw cycles at -20°C promoted slight but significant changes in serum concentrations of ferritin and transferrin. These variations were discreet, which does not affect the clinical interpretation of the result. However, it is recommended to quantify these proteins in fresh samples, since the successive freeze-thaw cycles can affect the conformational structure of the proteins.

Serum iron, ferritin, and transferrin were affected by the storage of samples at temperatures of 4°C, -20°C and -80°C for up to 4 weeks. It is speculated that the storage on these conditions may promote conformational changes and even mild denaturation of proteins, which may affect the results of ferritin and transferrin. Freezing urine samples, for example, can cause conformational changes in other proteins such as albumin [17, 18]. Also, the freezing and thawing of serum samples contribute to the occurrence of protein denaturation [19, 20]. This could also explain the changes found for ferritin and transferrin in the freezing and thawing cycles at -20°C. Since immunological assays are usually employed for measuring ferritin and transferrin, it is plausible to speculate that antibodies may not recognize modified proteins, which may affect the quantification of these proteins. For serum iron, we hypothesized that the conformational changes in transferrin might have influenced the amount of free iron available in the serum. Another hypothesis may be related to the evaporation of the samples during storage, as previously suggested [15]. This evaporation can promote the concentration of the samples and be related to falsely elevated serum iron results.

CONCLUSION

Serum concentrations of iron, ferritin, and transferrin were affected by the storage of samples at temperatures of 4°C, -20°C and -80°C for up to 4 weeks. Besides, freeze-thaw cycles at -20°C influenced the measurement of serum ferritin and transferrin. Therefore, it is recommended to measure these analytes preferably in fresh samples.

Acknowledgments

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

References

1. Lippi G, Chance JJ, Church S, et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. Clin Chem Lab Med. 2011; 49: 1113-1126 (PMID: 21517699).

2. Simundic AM, Lippi G. Preanalytical phase – a continuous challenge for laboratory professionals. Biochem Med. 2012; 22: 145-149 (PMID: 22838180).

3. Nielsen BK, Frederiksen T, Friis-Hansen L, Larsen PB. Post-analytical stability of 23 common chemistry and immunochemistry analytes in incurred samples. Clin Biochem 2017; 50: 1175-1182 (PMID: 28803962).

4. Green SF. The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. Clinical Biochemistry 2013; 46: 1175-1179 (PMID: 23769816).

5. Ogawa C, Tsuchiya K, Maeda K. Reticulocyte hemoglobin content. Clin Chim Acta 2020; 504: 138-145 (PMID: 32014518)

6. Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Regulators of Iron Homeostasis: New Players in Metabolism, Cell Death, and Disease. Trends Biochem Sci. 2016; 41: 274-286 (PMID: 26725301).

7. Svobodova H, Kosnáč D, Tanila H, et al. Iron-oxide minerals in the human tissues. Biometals 2020; 33: 1-13 (PMID: 31970541).

8. Gruszewska E, Wrona A, Gudowska M, et al. The transferrin isoforms in chronic hepatitis. Clin Biochem. 2017; 50: 1131-1135 (PMID: 28673788).

9. Boshuizen M, van der Ploeg K, von Bonsdorff L, et al. Therapeutic use of transferrin to modulate anemia and conditions of iron toxicity. Blood Rev. 2017; 31: 400-405 (PMID: 28755795).

10. Gomme PT, McCann KB, Bertolini J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. Drug Discov Today 2005; 10: 267-273 (PMID: 15708745).

11. Li H, Qian ZM. Transferrin/Transferrin Receptor Mediated Drug Delivery. Medicinal Research Reviews 2002; 22: 225-250 (PMID: 11933019).

12. Knovich MA, Storey JA, Coffman LG, Torti SV, Torti FM. Ferritin for the clinician. Blood Rev. 2009; 23: 95-104 (PMID: 18835072).

13. Jansen EHJM, Beekhof PK, Schenk E. Long-term stability of biomarkers of the iron status in human serum and plasma. Biomarkers 2013; 18: 365-368 (PMID: 23627617).

14. Sacri AS, Ferreira D, Khoshnood B, Gouya L, Barros H, Chalumeau M. Stability of serum ferritin measured by immunoturbidimetric assay after storage at -80°C for several years. PLoS One 2017; 12: 1-9 (PMID: 29228047).

15. Gislefoss RE, Grimsrud TK, Morkrid L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. Clin Chem Lab Med. 2009; 47: 596-603 (PMID: 18752145).

16. Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. Ann Clin Biochem. 2008; 45: 375-379 (PMID: 18583622).

17. Osberg I, Chase HP, Garg SK, et al. Effects of storage time and temperature on measurement of small concentrations of albumin in urine. Clin. Chem. 1990; 36: 1428-1430 (PMID: 2387037).

18. Elving LD, Bakkeren JA, Jansen MJ, de Kat Angelino CM, de Nobel E, van Munster PJ. Screening for microalbuminuria in patients with diabetes mellitus: frozen storage of urine samples decreases their albumin content. Clin. Chem. 1989; 35: 308-310 (PMID: 2914381).

19. Cuhadar S, Koseoglu M, Atay A, Dirican A. The effect of storage time and freeze-thaw cycles on the stability of serum samples. Biochemia Medica 2013; 23: 70-77 (PMID: 23457767).

20. Cao E, Chen Y, Cui Z, Foster PR. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. Biotechnol Bioeng. 2003; 82: 684-690 (PMID: 12673768).

Table 1. Baseline characteristics of the study population.

Variables	Values
Age (years)	43.4 ± 12.4
Male (%)	60
BMI (kg/m^2)	27.9 ± 4.2
Fasting glucose (mg/dL)	91 (82–103)
AST (U/L)	24 (18–40)
ALT (U/L)	24 (15–36)
Total cholesterol (mg/dL)	219 ± 45
HDL cholesterol (mg/dL)	59 ± 15
Triglycerides (mg/dL)	160 (96–254)

Data are expressed as mean ± SD or median and interquartile range. BMI, body mass index; AST, aspartate aminotransferase; ALT, alanine aminotransferase; HDL, high-density lipoprotein.

Table 2. Effects of the freeze/thaw cycles on serum iron, ferritin, and transferrin.

	Basal	**Cycle 1**	**Cycle 2**	**Cycle 3**	**p-value**
Iron					
-20°C	89 ± 19	86 ± 22	82 ± 18	85 ± 21	0.239
-80°C	89 ± 19	81 ± 19	80 ± 19	79 ± 13	0.088
Ferritin					
-20°C	117 ± 81	115 ± 80	116 ± 81	118 ± 83	0.003
-80°C	117 ± 81	114 ± 80	116 ± 80	120 ± 86	0.191
Transferrin					
-20°C	287 ± 46	282 ± 45	284 ± 44	294 ± 44	0.002
-80°C	287 ± 46	283 ± 43	284 ± 44	291 ± 40	0.074

Serum concentrations of iron and ferritin were expressed in μg/L, and serum transferrin values were expressed in mg/dL. Values were expressed as mean ± SD.

Table 3. Stability of serum iron, ferritin and transferrin in different temperatures up to 28 days.

	Days						
	Fresh	**1**	**7**	**14**	**21**	**28**	**p-value**
Iron							
4°C	89 ± 19	89 ± 18	97 ± 21	106 ± 22	104 ± 22	115 ± 20	<0.001
-20°C	89 ± 19	89 ± 17	90 ± 18	79 ± 18	89 ± 17	97 ± 18	0.003
-80°C	89 ± 19	90 ± 16	90 ± 17	78 ± 20	91 ± 19	95 ± 18	0.004
Ferritin							
4°C	117 ± 8	174 ± 86	110 ± 64	174 ± 87	184 ± 95	185 ± 94	<0.001
-20°C	117 ± 8	175 ± 87	140 ± 69	168 ± 87	169 ± 87	167 ± 84	<0.001
-80°C	117 ± 8	173 ± 87	150 ± 73	168 ± 87	175 ± 89	151 ± 81	<0.001
Transferrin							
4°C	287 ± 46	263 ± 38	264 ± 36	251 ± 34	277 ± 45	259 ± 35	0.001
-20°C	287 ± 46	257 ± 37	248 ± 36	223 ± 29	248 ± 34	226 ± 33	<0.001
-80°C	287 ± 46	271 ± 39	248 ± 36	235 ± 43	250 ± 37	223 ± 33	<0.001

Serum concentrations of iron and ferritin were expressed in μg/L, and serum transferrin values were expressed in mg/dL. Values were expressed as mean ± SD.

6 CONCLUSÃO

- O armazenamento das amostras nas temperaturas de 4°C, -20°C e -80°C por até quatro semanas provocou efeitos sobre a estabilidade dos analitos ferro, ferritina e transferrina, cujas concentrações séricas foram afetadas. Em relação ao ferro e a ferritina, a temperatura que provocou mais variações foi a de 4°C. No entanto, a transferrina foi mais afetada quando armazenada a -20°C.
- As concentrações séricas de ferro e de ferritina foram influenciadas quando as amostras foram submetidas aos ciclos de congelamento/descongelamento realizados a -20°C. O analito ferro não foi impactado pelos ciclos de congelamento/descongelamento em nenhuma temperatura testada.
- Na determinação destes analitos é recomendada a utilização, preferencialmente, de amostras frescas.
- Em conclusão, os analitos do *status* do ferro demonstraram ser mais sensíveis ao armazenamento do que à exposição a ciclos de congelamento/descongelamento, apesar das alterações nos resultados não apresentarem uma grande repercussão clínica. Assim, apesar de algumas limitações, esse estudo contribui para o conhecimento a respeito dos impactos provocados pelas diferentes condições pré-analíticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, J.; KOWDLEY, K.V. HFE-associated hereditary hemochromatosis. **Genetics in Medicine**, v. 11, p. 307-313, 2009.

ANDREWS, N.C. Disorders of iron metabolism. **The New England Journal of Medicine**, v.341 p.1986-1995, 1999.

BOGDAN, A.R. et al. Regulators of iron homeostasis: new players in metabolism, cell death, and disease. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, p. 274-286, 2016.

BOSHUIZEN, M. et al. Therapeutic use of transferrin to modulate anemia and conditions of iron toxicity. **Blood Reviews**, v. 31, p. 400-405, 2017.

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

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz Fundamentos de Química Clínica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CAO, E. et al. Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. **Biotechnology Bioengineering**, v. 82: p. 684-690, 2003.

CHUNG, M.C.M. Stucture and function of transferrin. **Biochemical Education**, v. 12, p. 146-154, 1984.

COMSTOCK, G.W. et al. Effects of repeated freeze-thaw cycles on concentrations of cholesterol, micronutrients, and hormones in human plasma and serum. **American Journal of Epidemiology,** v.168(7), p. 827-830, 2008.

COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B. Iron deficiency and the measurement of iron status. **Nutrition Research Reviews**, v. 5 p. 189-202, 1992.

DE JONG, G.; VAN DIJK, J. P.; VAN EIJK, H. G.The biology of transferrin. **Clinica Chimica Acta**, v. 190, p. 1-46, 1990.

DOMELLÖF, M. Iron requirements, absorption and metabolism in infancy and childhood. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care,** v.10, p. 329-335, 2007.

DONNELLY, J.G. et al. Stability of twenty-five analytes in human serum at 22 degrees C, 4 degrees C, and -20 degrees C. **Pediatric pathology and laboratory medicine,** v. 15 p. 869-874, 1995.

FINCH, C.A. et al. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. **Western Journal of Medicine,** v.145, p.657-663, 1986.

FRANKS, F. **Biophysics and biochemistry at low temperature**. London:

Cambridge University Press, 1985.

GISLEFOSS, R.E., GRIMSRUD, T.K.; MORKRID, L. Stability of selected serum proteins after long-term storage in the Janus Serum Bank. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine,** v. 47, p. 596-603, 2009.

GOMME, P.T.; MCCANN, K.B.; BERTOLINI, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. **Drug Discovery Today**, v. 10, p. 267-273, 2005.

GREEN, S.F. The cost of poor blood specimen quality and errors in preanalytical processes. **Clinical Biochemistry**, v. 46, p. 1175-1179, 2013.

GREGORY, J.A.; DAVID, M.F. Current understanding of iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, suppl. 6, p. 1559S-1566S, 2017.

GROTTO, H.Z.W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, supl. 2, p. 22-28, 2010.

GRUSZEWSKA, E. et al. The transferrin isoforms in chronic hepatitis. **Clinical Biochemistry**, v. 50, p. 1131-1135, 2017.

GUDER, W.G. et al. **Samples: from the patient to the laboratory**. 3rd ed. Darmstadt: Wiley VCH, 2003.

HENRIKSEN, L.O. et al. Stability of 35 biochemical and immunological routine tests after 10 hours storage and transport of human whole blood at 21 degrees C. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 74, p. 603-610, 2014.

International Standards Organization. GUIDE 30. Terms and definitions used in connection with reference materials. **ISO**. Geneva, 2015.

JANSEN, E.H.J.M.; BEEKHOF, P.K.; SCHENK, E. Long-term stability of biomarkers of the iron status in human serum and plasma. **Biomarkers**, v. 18, p. 365-368, 2013.

JIANG, S.; NAIL, S.L. Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freezing–drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics,** v. 45 p. 249-257, 1998.

KNOVICH, M.A. et al. Ferritin for the clinician. **Blood Reviews**, v. 23, p. 95-104, 2009.

KUBASIK, N.P. et al. Effect of duration and temperature of storage on serum analyte stability: examination of 14 selected radioimmunoassay procedures. **Clinical Chemistry**, v. 28, p.164-165, 1982.

LI, H.; QIAN, Z.M. Transferrin/transferrin receptor mediated drug delivery. **Medicinal Research Reviews**. v. 22, p. 225-250, 2002.

LIPPI, G. et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, V. 49, p.1113-1126, 2011.

MCLEAN, E. et al. Worldwide prevalence of anaemia, WHO vitamin and mineral nutrition information system, 1993–2005. **Public Health Nutrition,** v. 12, p. 444-454, 2009.

MOTTA, V.T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 5ed. Brasil, 2009.

NIELSEN, B. K. et al. Post-analytical stability of 23 common chemistry and immunochemistry analytes in incurred samples. **Clinical Biochemistry**, v. 50, p. 1175-1182, 2017.

OGAWA, C.; TSUCHIYA, K.; MAEDA, K. Reticulocyte hemoglobin content. **Clinica Chimica Acta**, v. 504, p.138-145, 2020.

PAPANIKOLAOU, G.; PANTOPOULOS, K. Iron metabolism and toxicity.**Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 202, p. 199-211, 2005.

RHOADES, R.; BELL, D. **Medical Phisiology: Principles for Clinical Medicine**. 5 ed., p. 533-539, 2017.

SACRI, A.S. et al. Stability of serum ferritin measured by immunoturbidimetric assay after storage at -80°C for several years. **PLoS One**, v.12, p. 1-9, 2017.

SGOUTAS, D.S.; TUTEN, T. Effect of freezing and thawing of serum on the immunoassay of lipoprotein(a). **Clinical Chemistry**, v. 38, p.1873-1877, 1992.

SIMUNDIC, A.M.; LIPPI, G. Preanalytical phase – a continuous challenge for laboratory professionals. **Biochemia Medica,** v. 22, p. 145-149, 2012.

STODDARD, L. et al. Freeze/thaw stability of transferrin, and reference values obtained with kinetic nephelometry. **Clinical Chemistry**, v. 30, p. 114-115, 1984.

SUBRAMANIAN, K.S. Storage and preservation of blood and urine for trace element analysis.
Biological Trace Element Research, v.49, p.187-210, 1995.

SVOBODOVA, H. et al. Iron-oxide minerals in the human tissues. **Biometals**, v. 33, p.1-13, 2020.

TANNER, M. et al. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation.
Annals of clinical biochemistry, v. 45 p. 375-379, 2008.

TORTI, F.M.; TORTI, S.V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, v. 99, p. 3505-3516, 2002.

VIEIRA, F.P.; REDIGUIERI, Camila F.; REDIGUIERI, Carolina F. **A Regulação de Medicamentos no Brasil**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

WANG, C.Y.; BABITT, J.L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood,** v.133, p.18-29, 2019.

WIDDOWSON, E.M.; SOUTHGATE, D.A.; HEY, E.; Lindblad B.S. Fetal growth and body composition. **Perinatal Nutrition**, New York: Academic Press. p. 3-14, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control. **A guide for programme managers Geneva: World Health Organization (WHO)**; 2001.

ANEXO A – MANUSCRITO CIENTÍFICO ACEITO

Dear Professor Moresco,

Thank you very much for sending your manuscript.
We are pleased to inform you that your manuscript entitled

„Effects of the freeze-thaw cycles and assessment of short-term stability on serum iron, ferritin, and transferrin"

has been accepted for publication in issue 02/2021 of our journal "*Clinical Laboratory*".

The manuscript will be forwarded to scientific and linguistic editing. After that you will receive the galley proof.
Please return the original of the signed copyright transfer as soon as possible with separate mail to the address of our Editorial Office:
Clinical Laboratory GmbH
Editorial Office
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim/GERMANY
You can send us in addition a scanned copy of the signed copyright transfer with e-mail attachment.

Best regards,

Christina Noske (Mrs)

Clinical Laboratory Publications GmbH
Editorial Office
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim/GERMANY
T: +49 6251 70190-246
F: +49 6251 70190-409
E: cnoske@clin-lab-publications.com
Homepage: www.clin-lab-publications.com