

FRUTOSAMINA: UMA REVISÃO DOS ÚLTIMOS DEZ ANOS

Heidi Pinto MARTINS*
Lúcia Nassi CASTILHO*

Riala 6/736

Martins, H.P. e col. — Frutosaminas: uma revisão dos últimos dez anos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. 52(1/2):101-104, 1992.

A manutenção da taxa de glicose sangüínea tão próxima quanto possível dos níveis normais tem sido amplamente aceita como um bom índice de acompanhamento, podendo reduzir significativamente as seqüelas do diabetes⁷. Medidas diárias múltiplas da glicemia não são freqüentemente um caminho prático no controle do diabético, embora pudessem ser consideradas como o melhor método de controle.

Durante a década de 70, diversas técnicas para a mensuração das hemoglobinas glicadas tornaram-se acessíveis à grande maioria dos laboratórios⁵, fornecendo uma indicação retrospectiva dos níveis de glicose sanguínea das últimas quatro semanas e têm sido largamente adotadas como uma maneira usual deste mesmo controle diabético. A maioria das técnicas tentam medir a HbA_{1c}, originalmente descrita como a mais abundante das frações glicadas da hemoglobina que se encontram aumentadas nos diabéticos.

Durante a última década vários métodos foram desenvolvidos para mensurar outras proteínas glicadas além da HbA_{1c}. A descoberta de que outras proteínas séricas são glicadas em caminhos análogos ao da hemoglobina despertou muito interesse quanto à sua aplicação clínica. A albumina glicada tem sido indicada como um índice para o controle glicêmico num tempo de duas, três semanas, um período menor do que o da hemoglobina glicada, mas suficiente para ser adotada como controle²⁸.

INTRODUÇÃO

Os métodos para a medida das proteínas glicadas incluem afinidade cromatográfica^{7,28}, espectrofotometria baseada na reação do ácido tiobarbitúrico⁵ e cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) de resíduos lisina glicados após hidrólise das proteínas²². Cada um desses métodos é capaz de dar bons resultados em mãos experientes. Contudo, com exceção do método da afinidade cromatográfica os outros são muito caros, exigindo aparelhagem especial, o que dificulta sua utilização na rotina da maioria dos laboratórios clínicos.

Em 1983 Johnson, Metcalf e Baker¹¹ descreveram um ensaio de frutosamina baseado na habilidade dos resíduos cetoaminas glicados das proteínas séricas em reduzir o corante azul de nitrotetrazólio (NBT). O termo *frutosamina* se refere à estrutura do produto de

rearranjo da cetoamina (1-deoxi-1-E-llsl-albumina-frutose) formada como o resultado da reação não enzimática entre a glicose e o grupo E amino dos resíduos lisina da albumina. A interferência de outras substâncias redutoras do soro (glicoso e uratos) na determinação das frutosaminas pode ser evitada mantendo o pH da reação, ao redor de 10, 35.

A concentração da frutosamina reflete largamente o nível da albumina glicada e só 20% da atividade redutora se deve a outras proteínas séricas¹².

A facilidade com que o ensaio da frutosamina pode ser automatizado e a excelente precisão analítica dos aparelhos atuais proporcionam um coeficiente de variação de 5%, mostrando que o ensaio é um ótimo monitoramento para os pacientes diabéticos¹⁷. Apesar destas vantagens, problemas surgidos com a calibração e otimização das condições de reação têm limitado sua aplicação em muitos laboratórios.

* Pesquisadoras Científicas da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP.

Mais recentemente, têm sido estudados os efeitos da concentração protéica, que influem principalmente na especificidade analítica, ocasionando confusão na interpretação dos resultados. A falta de consenso nas características importantes do ensaio reduz a confiança nas avaliações clínicas efetuadas e revela dificuldades quando comparamos concentrações de frutosamina obtidas em centros diferentes.

O objetivo desta revisão é recomendar certos procedimentos técnicos para evitar erros devido à falta de conhecimento técnico. Não é nossa intenção recomendar o uso de um ensaio de frutosamina sérica em lugar de outro, mas sim analisar as diversas etapas da reação:

1. Condições do ensaio
2. Calibração
3. Influência da concentração protéica

MECANISMO DE REAÇÃO

O mecanismo preciso pelo qual a proteína glicada reduz o corante azul de nitrotetrazólio (NBT) em Formazana é muito discutido mas não totalmente elucidado. Jones e cols.¹³ observaram que 47% da atividade redutora da frutosamina seria inibida pela adição da enzima superóxido desmutase (uma enzima da fermentação do lixo). Isto permite então propor um mecanismo de reação com o estudo dos radicais livres intermediários. A cetoamina que resulta da glicação das proteínas existe em equilíbrio com seu tautômero eneaminol. Tanto a cetoamina como o eneaminol são capazes de reduzir o oxigênio molecular, formando então um radical superóxido que por sua vez reduz o NBT. A formação do radical superóxido implica numa auto-oxidação simples de elétrons da cetoamina produzindo um radical livre intermediário de proteína glicada.

Sakural e Tsuchiya²⁰ propuseram recentemente um mecanismo alternativo no qual a forma enediol da cetoamina é oxidada a radical alcoxi pelos íons de metal pesado presentes como traços contaminantes no tampão do ensaio. O radical alcoxi é então capaz de produzir radicais superóxidos.

CONDIÇÕES DA REAÇÃO

Das condições do ensaio depende a sensibilidade da reação.

a) Temperatura

A reação entre a proteína glicada e NBT se realiza mais facilmente em temperaturas elevadas e a temperatura de eleição foi 40°C, devendo ser constante durante todo o período da reação. A temperatura dos banhos nos instrumentos utilizados na grande maioria dos laboratórios clínicos oscila entre 25, 30 ou 37°C. Alguns autores¹ estudaram as diferenças entre 37 e 40°C e a temperatura de 37°C parece ser a que melhor se adapta ao ensaio.

b) Comprimento de onda

Proteínas glicadas reduzem o corante NBT produzindo a formazana que liga-se preferencialmente à albumina. O espectro de absorção da proteína glicada/ complexo corado reduzido parece ser diferente de acordo com a fonte de proteína glicada¹⁹. Howey e cols.⁹ observaram detalhadamente o espectro de absorção do NBT reduzido na presença de soro humano e na ausência de detergente e encontraram o comprimento de onda de máxima absorbância em 540 nm. A adição de detergente Triton X-100¹⁸ ou uma mistura de detergentes iônico e não iônico²⁴ muda as características do espectro tanto na reação com soro humano glicado/formazana como no DMF/formazana (padrão primário) tornando-os idênticos. Outros agentes calibradores como dihidroxicetona¹⁸ e polilisina glicada²³ também formam produtos corados com espectro de absorção muito similar ao do soro humano-Formazam.

c) Reagente tampão e pH

Baker e Johnson¹⁰ descreveram um reagente tampão contendo 75mmol/L de carbonato de sódio mais 25 mmol/L de bicarbonato de sódio produzindo um pH de 10, 35 a 25°C. Aconselha-se calibrar-se os pHmetros com calibradores comerciais (Hydrion pH 10 a 11 da Aldrich Chemical Co. Ltd. Gillingham UK).

d) Concentração do NBT

A concentração do NBT no ensaio precisa ser suficientemente alta para garantir uma linearidade acima de no mínimo três vezes o limite máximo dos valores normais.

e) Período de pré-incubação

O método original para determinação das frutosaminas séricas¹¹ envolvia uma fase de pré-incubação dos reagentes e soros por dez minutos, antes da primeira leitura. Trabalhos recentes^{16,19,21} sugerem uma diminuição deste período de incubação.

f) Amostra/Proporção de reagentes

A diluição da amostra não deve exceder 1:10³ embora a maioria dos trabalhos optem por diluições entre 1:10 e 1:17,5.

CALIBRAÇÃO DO ENSAIO

A) Usando um padrão não sérico: 1-deoxi-1-morfolino-D-frutose (DMF).

O DMF foi utilizado pela primeira vez como padrão no ensaio da frutosamina por Johnson e cols.¹² sendo um composto sintético, quimicamente bem definido como uma cetoamina de fácil preparação, devendo ser dissolvido numa solução de albumina para prevenir mudanças no espectro de absorção do composto colorido final, o azul de tetrazólio. O uso deste tipo de calibrador pode tornar-se um problema se a formulação dos reagentes não incluir detergentes^{1,19,25}. Uma

forma encontrada por diversos autores para a minimização desta interferência foi o uso do DMF diluído em um "pool" de soro humano^{9,26}.

Os precursores Baker e Johnson^{1,12} recomendam padrões de proteínas glicadas como calibradores secundários para o ensaio, que podem diminuir mas não eliminar as alterações no ensaio^{8,14}. O uso de detergente na mistura de reação^{18,24} parece minimizar os problemas relatados e também reduzir a variação interlaboratorial.

Outros calibradores têm sido indicados e entre eles a dihidroxicetona¹⁸ e espera-se só um maior número de publicações para que ele possa ser aceito. Lever e col.¹⁵ publicaram alguns trabalhos preliminares com o uso de padrões de Elisina e valina. Farr e cols.⁴ sugerem o uso de globulina purificadas como material de referência. A concentração ideal dos resíduos de aminoácidos glicados foi calculada pela medida fluorimétrica do formaldeído liberado da globulina glicada após oxidação com periodato⁶.

Schieler e Wieland²² desenvolveram um método específico para proteínas glicadas usando cromatografia líquida de alta resolução (HPLG) para medir frusina (E-N(2- furilimetil)-L- lisina), um derivado da lisina glicada liberado das frutosaminas após a hidrólise ácida. Este método tem sua aplicação limitada sendo usado mais para pesquisas. Recentemente, os mesmos autores²³ estudaram o emprego de um polilisina glicada pela análise elemental do carbono¹⁴. Estes resultados confirmam aqueles obtidos com HPLG.

Efeito da concentração protéica. O resultado da medida das proteínas séricas glicadas tem sido expresso como % ou mmol da proteína total. A determinação das frutosaminas séricas foi primeiro descrita como uma medida simples da proteína sérica glicada sem referência à proteína total. Johnson e cols.^{11,12} e mais tarde Staley²⁷ afirmam que dentro da faixa da concentração fisiológica da

albumina a relação de glicação protéica independe da concentração da albumina porque a conformação protéica das proteínas séricas é bem diferente da forma carbonil reativa da glicose. Contudo um número grande de estudos tem publicado correlações estatísticas significativas entre as concentrações da albumina e frutosamina séricas dentro das faixas de normalidade^{9,29}, durante a gravidez³⁰ e durante o tratamento de pacientes diabéticos em ceto-acidose²⁶.

Outras substâncias podem causar interferências no resultado final da concentração das frutosaminas e entre elas têm sido estudadas: heparina (80 000 UI/L), EDTA (5.5 g/L), bilirrubina (428 μ mol/L), triglicerídeos (7.45 mmol/L), uratos (0.93 mmol/L), ascorbato (0.57 mm.O-L) e cisteína (0.5 mmol/L) que podem produzir uma interferência analítica de 0.1 a 0.3 mmol/L. Tanto a hiperuricemia severa (0.93 mmol/L) quanto a hipertrigliceridemia (7.45 mmol/L) são conseqüências metabólicas do descontrole do diabetes e uma incôgnita que o laboratório precisa levar em conta dependendo da população diabética.

Siedel e cols.¹⁸ empregaram uma variante técnica acrescentando uricase (4U/L) que pode reduzir a interferência dos uratos e uma mistura de detergentes iônico e não-iônico (22g/L) que pode reduzir a interferência dos triglicerídeos.

CONCLUSÃO

A especificidade do ensaio de frutosamina depende de vários fatores que vão desde a concentração do NBT até o tempo e temperatura de incubação do ensaio. Todas as recomendações desta revisão foram coletadas de trabalhos publicados nos últimos dez anos e procuram alertar os pesquisadores para os problemas técnicos que possam enfrentar nos laboratórios.

RIALA 6/736

Martins, H.P. *et al.* — *Fructosamine: a review for the last ten years.* *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 52(1/2):101-104, 1992.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BAKER, J.R., METCALF, P.A., JOHNSON, R.N., NEWMAN, D. & RIETZ, P. — Use of protein based standards in automated colorimetric determinations of fructosamine in serum. *Clin. Chem.* 31: 1550-1554, 1985.
2. BLAIR, S.C., SCHIER, G.M. & GAN, I.E.T. — More on serum fructosamine assay. *Clin. Chem.* 33: 446-7, 1987.
3. GHOROMY, V., BREINEK, P., SKELPLOVA, A. VALENDINOVA, M — Fructosamine: matrix problems with standards based on protein matrices. *Clin. Chem.* 35: 191-2, 1989.
4. FARR, G., PEAGOGK, M.K. & RYALL, R.G. — Evaluation of purified glovin as a primary standard for plasma fructosamine assay. *Clin. Biochem Revs.* 8: 133, 1987.
5. FLUGKIGER, R & WINTERHALTER, K.H. — In vitro synthesis of haemoglobin A1c. *FEBS Lett* 71: 356-60, 1976.
6. GALLOP, P. M., FLUCKIGER, r., HANNEKEN, A., MININSHON, M.M. & GABBAY, K.H. —

- Chemical quantification of haemoglobin glycosylation: fluorometric detection of formaldehyde released upon periodate oxidation of glycoglobulin. *Anal. Biochem.* 117: 427, 1981.
7. GOULD, B.J. HALL, P.M. & COOK, J.G. — A sensitive method for the measurement of glycosylated plasma proteins using affinity chromatography. *Ann Clin. Biochem.* 21:16-21, 1984.
 8. HILL, R.P. The effect of calibration on the between laboratory variation of serum fructosamine. *Ann. Clin. Biochem.* 25: 435-9, 1987.
 9. HOWEY, J.E., BROWNING, M.C. & FRASER, C.G. — Assay of serum fructosamine that minimizes standardisation and matrix problems: use to assess components of biological variation. *Clin. Chem.* 33: 269-72, 1987.
 10. JOHNSON, R.N. & BAKER, J.A.R. — Fructosamine assay (Letter). *Ann. Clin. Biochem.* 22: 655-6, 1985.
 11. JOHNSON, R.N., METCALF, P.A. & BAKER, J.R. — Relationship between albumin and fructosamine concentration in diabetic and non-diabetic sera. *Clin. Chem. Acta.* 164: 151-62, 1987.
 12. JOHNSON, R.N., METCALF, P.A. & BAKER, J.R. — Fructosamine: A new approach to the estimation of serum glycosyl protein. An Index of diabetic control. *Clin. Chim. Acta.* 127: 87-95, 1983.
 13. JONES, A.F., WINKLER, J.W., THORMALLEY, P.J. LUNEC, J., JONNINGS, P.E. & BARNETT, A.H. — Inhibitory effect of superoxide dismutase on fructosamine activity. *Clin. Chem.* 33: 147-9, 1987.
 14. KOSKINEN, P., IRJALA, K., VIKARI, J., PANULA-ONTTO, R. & MATIKAINEN, M.T. — Serum fructosamine in the assesment of glycaemic control in diabetes mellitus. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 47: 285-92, 1987.
 15. LEVER, M., FOWLER, R.T., FREEAR, G. J. & DODDS-SCARF, P.M. — More on serum fructosamine assay. *Clin. Chem.* 33: 447-8, 1987.
 16. LIM, C.V., CHISNALL, W.N. & CROOKE, M.J. — Effect of shortened pre-incubation on results of fructosamine in normal diabetic and quality control sera. *Clin. Chem.* 34: 179, 1988.
 17. LLOYD, D. & MARPLES, J. — Simple colorimetry of glycosylated serum protein in a centrifugal analyser. *Clin. Chem.* 30: 1686-1688, 1984.
 18. PHILLIPOU, G. SEABORN, G.J. & PHILLIPS, P.J. — Re-evaluation of the fructosamine reaction. *Clin. Chem.* 34: 1561-4, 1988.
 19. PUUKKA, R. — Modification of the fructosamine test. *Ann. Clin. Biochem.* 24: 211, 1987.
 20. SAKURAI, T. & TSUCHIYA, S. — Superoxide production from nonenzymatically glycosylated protein. *FEBS Lett* 236: 406-10, 1988.
 21. SAN GLI, F., SCHIER, G.M., MOSES, R.G. & GAN, I.E.T. — Improved estimation of fructosamine as a measure of glycosylated serum protein, with the Technicon RA-1000 analyser. *Clin. Chem.* 31: 2005-6, 1985.
 22. SCHELEICHER, R. & WIELAND, O.H. — Specific quantification by HPLC of protein (Lysine) bound glucose in human serum albumin and other glycosylated proteins. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19: 81-7, 1981.
 23. SCHLEICHER, E.D. & VOGT, B.W. — Standardization of fructosamine assays. *Clin. Chem.* 36: 136-9, 1990.
 24. SIEDEL, J., VOGT, B., KERSCHER, L. & ZEIGENHORN, J. — Serum fructosamine assay: two different color reagents compared with reference to a HPLC procedure. *Clin Chem.* 34: 1316, 1988.
 25. SENG, L.Y. & STALEY, M.J. — A 10 minute pre-incubation is required for measurement of fructosamine in plasma. *Clin. Chem.* 32: 403-4, 1986.
 26. SIMD, E., FERENCZ, A., FODOR, M. — Use of pooled human serum in the standardisation process of the serum fructosamine determination for the estimation of glycosylated serum proteins. *Clin. Chim. Acta.* 156: 215-20, 1986.
 27. STALEY, M.J. — Fructosamine and protein concentration in serum (Letter). *Clin. Chem.* 33: 2326-7, 1987.
 28. YATOSOFF, R.N., TEVAARWERK, G.J. & McDONALD, J.C. — Quantification of nonenzymatically glycosylated albumin and total serum protein by affinity chromatography. *Clin. Chem.* 30: 446-9, 1984.
 29. VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., SEYNAEVE, C., BROMBACHER, P.J. — Influence of variations in albumin or total protein concentration on serum fructosamine concentration. *Clin. Chem.* 32: 1610, 1986.
 30. VAN DIEIJEN-VISSER, M.P., SALEMANS, T., VAN WERSCH J.W.J., SCHELLE KEUS, L.A., BROMBACHER, P.J. — Glycosylated serum proteins and glycosylated haemoglobin in normal pregnancy. *Ann. Clin. Biochem.* 23: 661-6, 1986.

Recebido para publicação em 22 de janeiro 1991.