

WILLIAM PEDROSA DE LIMA

**A DOSAGEM DA FRUTOSAMINA NO DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS
– CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO ADULTO
(ELSA-BRASIL)**

Orientador

Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Co-orientadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz

Belo Horizonte, Minas Gerais

2018

WILLIAM PEDROSA DE LIMA

**A DOSAGEM DA FRUTOSAMINA NO DIAGNÓSTICO DO DIABETES
MELLITUS– CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO
ADULTO (ELSA-BRASIL)**

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS
GERAIS COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM
PATOLOGIA – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO
EM PATOLOGIA INVESTIGATIVA

Orientador

Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

Co-orientadora

Profa. Dra. Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz

Belo Horizonte, Minas Gerais

2018

L732d Lima, William Pedrosa de.
A dosagem da frutossamina no diagnóstico do diabetes mellitus [manuscrito]: contribuição do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). / William Pedrosa de Lima. - - Belo Horizonte: 2018. 111f.: il.

Orientador (a): Guatimosim Vidigal.
Coorientador (a): Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz.
Área de concentração: Patologia Investigativa.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Frutossamina. 2. Diabetes Mellitus. 3. Diagnóstico. 4. Saúde do Adulto. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Vidigal, Guatimosim. II. Diniz, Maria de Fátima Haueisen Sander. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 75



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

UFMG

FOLHA DE APROVAÇÃO

A DOSAGEM DA FRUTOSAMINA NO DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS –
CONTRIBUIÇÃO DO ESTUDO LONGITUDINAL DE SAÚDE DO ADULTO
(ELSA-BRASIL)


WILLIAM PEDROSA DE LIMA

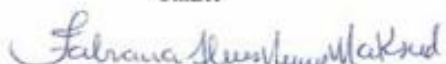
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em PATOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA INVESTIGATIVA.

Aprovada em 10 de dezembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

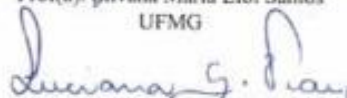

Prof(a). Pedro Guatimosim Vidigal - Orientador
UFMG


Prof(a). Maria de Fátima Haucisen Sander Diniz
UFMG


Prof(a). Paulo Augusto Carvalho Miranda
UnBH


Prof(a). Fabiana Nunes Maksud
UFOP


Prof(a). Silvana Maria Eloi Santos
UFMG


Prof(a). Luciana de Gouvêa Viana
UFMG

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2018.

Dedico,

À minha família, amigos e colegas de trabalho, pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Pedro Guatimosim Vidigal, e à minha co-orientadora, Professora Maria de Fátima Hauesein Sander Diniz, pela assistência e apoio incondicionais na condução desse importante projeto.

Ao Professor Leonardo Maurício Diniz, pela sua orientação nos meus primeiros passos na Endocrinologia.

RESUMO

A frutossamina é o resultado da glicação não enzimática da glicose às proteínas, notadamente a albumina. Sua utilização tem sido historicamente associada ao monitoramento do diabetes mellitus, e, mais recentemente, como teste diagnóstico. A frutossamina fornece informação sobre o controle do diabetes nas últimas duas a quatro semanas, período intimamente relacionado à meia vida da albumina. Um dos objetivos deste trabalho é a avaliação do seu desempenho frente aos outros marcadores para hiperglicemia já estabelecidos, glicemia plasmática de jejum (GJ), glicemia 2h após sobrecarga oral de glicose (2-h PD) e hemoglobina glicada (A1c), podendo contribuir para a definição do seu papel no diagnóstico do diabetes. Outro objetivo é a geração de um intervalo de referência específico para a população brasileira, ainda não disponível. Trata-se de um estudo transversal com dados de base (2008-2010) de 2288 indivíduos do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). A geração do intervalo de referência seguiu o protocolo sugerido pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os níveis de frutossamina foram determinados pelo método colorimétrico (*Nitroblue Terrazolium* - NBT). Associações entre a frutossamina e os outros marcadores foram estabelecidas pelo coeficiente de correlação de Spearman. A avaliação entre os desempenhos diagnósticos foi realizada pela Área sob a Curva (AUC – Curva ROC). A frutossamina apresentou correlações significativas com a GJ, $r=0,26$ ($p<0,001$), a 2-h PD, $r=0,10$ ($p<0,001$) e A1c $r=0,22$ ($p<0,001$). As correlações entre glicemia de jejum e A1c foram semelhantes entre si, mas superiores à correlação com 2-h PD. A AUC da frutossamina (0,741), quando utilizados os critérios baseados na glicemia de jejum, foi similar à da A1c (0,782) para diagnóstico do diabetes ($p=0,207$). Quando utilizado 2-h PD como critério diagnóstico, a área da A1c (0,745) foi similar à área da frutossamina (0,678) com significância limítrofe ($p=0,053$). Glicemia de jejum e 2-h PD mostraram AUCs (0,844 e 0,801, respectivamente) superiores à da frutossamina (0,700), quando o diabetes foi estabelecido pela A1c ($p=0,005$ e $p=0,064$, respectivamente). Um total de 466 indivíduos foram selecionados para o estabelecimento do intervalo de referência. Foram excluídos os indivíduos sabidamente diabéticos, indivíduos com alterações nos testes clássicos para hiperglicemia e aqueles com alterações nos testes de microalbuminúria e creatinina. O intervalo de referência foi de 186 a 248 $\mu\text{mol/L}$ para mulheres e de 196 a 269 $\mu\text{mol/L}$ para homens. Os níveis de frutossamina foram maiores nos homens do que nas mulheres ($p = 0,006$) e na população não branca ($p = 0,034$). Além disso, apresentou correlação negativa com o índice de massa corporal ($r = -0,117$; $p = 0,011$). Frutossamina é associada com GJ, 2h-PD e A1c, sendo potencialmente útil no diagnóstico além do seu já reconhecido papel no monitoramento do diabetes. Estudos adicionais, capazes de sugerir valores de corte apropriados para o rastreamento do diabetes, devem ser considerados. O intervalo de referência criado neste estudo permitirá uma interpretação mais adequada do teste de frutossamina, especialmente em situações em que a hemoglobina glicada não poderá ser utilizada.

ABSTRACT

Fructosamine is the result of non-enzymatic glycation of glucose to proteins, notably albumin. Its use has historically been associated with monitoring of diabetes mellitus, and more recently as a diagnostic test. Fructosamine provides information on the control of diabetes in the last 2 to 4 weeks, a period closely related to the half-life of albumin. One of the objectives of this study is the evaluation of its performance against other established diagnostic markers, fasting plasma glucose (FPG), 2 h glucose after oral glucose overload (2-hr PG) and glycated hemoglobin (A1c) may contribute to the definition of its role in the diagnosis of diabetes. Another aim is the generation of a specific reference interval for the Brazilian population, not yet available. This is a cross-sectional study with baseline data (2008-2010) of 2228 individuals from the Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brazil). The establishment of the reference interval followed the protocol suggested by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The levels of fructosamine were determined by the colorimetric method (Nitroblue Tetrazolium - NBT). Associations between the fructosamine and the other markers were defined by Spearman's correlation coefficient. The evaluation between the diagnostic performances was performed by the Area under the Curve (AUC – ROC curve). Fructosamine presented significant correlations with FPG, $r = 0.26$ ($p < 0.001$), 2-hr PG, $r = 0.10$ ($p < 0.001$) and A1c $r = 0.22$ ($p < 0.001$). The correlations between FPG and A1c were similar to each other, but higher than the correlation with 2-h PG. The AUC of the fructosamine (0.741), when using criteria based on FPG, was similar to A1c (0.782) for diabetes diagnosis ($p = 0.207$). When 2-h PG was used as the diagnostic criterion, the area of A1c (0.745) was similar to the area of fructosamine (0.678) with borderline significance ($p = 0.053$). Fasting glucose and 2-h PG had AUCs (0.844 and 0.801, respectively) higher than that of fructosamine (0.700) when diabetes was defined by A1c ($p = 0.005$ and $p = 0.064$, respectively). A total of 466 individuals were selected for the establishment of the reference interval. Those individuals known to be diabetic, individuals with alterations in the classic tests for hyperglycemia and those with alterations in the tests of microalbuminuria and creatinine were excluded. The reference interval was 186 to 248 $\mu\text{mol} / \text{L}$ for women and 196 to 269 $\mu\text{mol}/\text{L}$ for men. The levels of fructosamine were higher in males than in females ($p = 0.006$) and in the non-white population ($p = 0.034$). In addition, it presented a negative correlation with body mass index ($r = -0.117$; $p = 0.011$). Fructosamine is associated with FPG, 2h-PG and A1c, potentially useful in the diagnosis in addition to its recognized role in monitoring of diabetes. Additional studies suggesting appropriate cutoff values for diabetes screening, should be considered. The reference range created in this study will allow a more adequate interpretation of the fructosamine test, especially in situations where glycated hemoglobin cannot be used.

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 - Critérios diagnósticos para Diabetes Mellitus – <i>American Diabetes Association</i> (ADA) 2018 | 16 |
| Tabela 2 - Características dos indivíduos participantes do estudo em conjunto e estratificados de acordo com o diagnóstico de diabetes..... | 29 |
| Tabela 3 - Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) de acordo com a cor da pele/raça autorreferidos..... | 30 |
| Tabela 4 - Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) na população branca e não branca estratificados de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus..... | 30 |
| Tabela 5 - Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) no sexo masculino e feminino segundo diagnóstico ou não de diabetes mellitus..... | 31 |
| Tabela 6 - Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) de acordo com a estratificação do IMC em indivíduos diabéticos e não diabéticos..... | 31 |
| Tabela 7 - Características dos indivíduos diabéticos autorreferidos e aqueles com diagnóstico recente..... | 33 |
| Tabela 8 - Desempenho da frutossamina e demais testes (AUC e intervalo de confiança de 95%) em cada uma das definições de novos casos de diabetes (grupos 1 a 4). Participantes com relato de diagnóstico de diabetes prévio foram excluídos da análise..... | 35 |

Tabela 9 - Sensibilidade e especificidade (IC95%) da frutossamina (valor de corte 257 $\mu\text{mol/L}$) e A1c (valor de corte 6,5%) nos pacientes diagnosticados pela glicemia de jejum e 2-h PD. Participantes com diagnóstico prévio de diabetes foram excluídos da análise.....36

Tabela 10 - Sensibilidade e especificidade da frutossamina (e o respectivo intervalo de confiança de 95%) no diagnóstico do diabetes de acordo com os pontos de corte sugeridos pela curva ROC. Participantes com diabetes autorreferido e/ou uso de insulina e medicamentos hipoglicemiantes foram excluídos da análise.....37

Tabela 11- Características laboratoriais e clínicas da população final para geração do intervalo de referência, linha de base do ELSA-Brasil para a construção do intervalo de referência (n=466)41

Tabela 12 - Modelo de regressão linear para a variável dependente frutossamina.....42

Tabela 13 - Intervalos de referência (95%) para frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) gerados a partir da população de um dos centros (Belo Horizonte) participantes do estudo ELSA-Brasil.....43

Tabela 14 - Coeficientes de correlação linear entre frutossamina e outros marcadores de hiperglicemia na população americana e brasileira (estudo atual)46

Tabela 15 - Desempenho diagnóstico da frutossamina de acordo com o critério diagnóstico mensurado a partir da área sob a curva (AUC-ROC) nos trabalhos de Jurascheck, Steffes e Selvin (2012b) e o presente trabalho.....47

Tabela 16 - Correlações de toda a população geral de cada um dos estudos entre frutossamina com os testes A1c e GJ.....50

| | |
|---|----|
| Tabela 17 - Intervalos de referência de frutossamina utilizando o método NBT segunda geração..... | 54 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - A reação da glicose e proteína para formar frutosamina..... | 19 |
| Figura 2 - Correlação entre frutosamina e glicemia de jejum (1A), 2h-PD (glicose 2h após sobrecarga de destrosol) (1B) e hemoglobina glicada (A1c) (1C). As linhas representam o valor de corte para cada teste utilizado neste estudo..... | 34 |
| Figura 3 - Características dos indivíduos diagnosticados pela frutosamina ($\geq 257 \mu\text{mol/L}$) ou A1c ($\geq 6,5\%$) para IMC, idade e circunferência abdominal..... | 38 |
| Figura 4 - Algoritmo do número final de participantes do estudo de intervalo de referência... | 39 |
| Figura 5 - Distribuição dos 466 indivíduos participantes do estudo para confecção do intervalo de referência para frutosamina..... | 40 |
| Figura 6 - Boxplots dos níveis de frutosamina em grupos de cinco concentrações de albumina (1, 13-38 g/L, n=7973; 2, 39-41 g/L, n=8751; 3, 42-43 g/L, n=8196; 4, 44 g/L, n=6384; 5, 45-55 g/L, n=9634). Linhas pontilhadas refletem a mediana da concentração da frutosamina em todos os pacientes ($241 \mu\text{mol/L}$) | 59 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

1,5-AG – 1,5 anidroglucitol

A1c – Hemoglobina Glicada

ADA – American Diabetes Association

AG - Albumina Glicada

ARIC – Atherosclerosis Risk in Communities

AUC – Area Under the Curve

CAMRI – Carotid Magnetic Resonance Imaging

DM – Diabetes Mellitus

DMF – 1-deoxi,1-morfolinofrutose (DMF)

EDTA – Ácido Etilenoaminotetracético

G2h – Glicemia plasmática 2h após sobrecarga oral de glicose

GJ – Glicemia de Jejum

HAS – Hipertensão Arterial Sistêmica

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Pressão

hs-PCR – Proteína C Reativa de alta sensibilidade

IDF – International Diabetes Federation

IMC – Índice de Massa Corporal

kDa - Kilodaltons

NBT – Nitrobluetetrazólio

ROC – Receiver Operating Characteristic

SBPC/ML – Sociedade Brasileira de Patologia Clínica e Medicina Laboratorial

TTOG – Teste de Tolerância Oral à Glicose

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

| | |
|---|-----|
| 1. INTRODUÇÃO | |
| 1.1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... | 15 |
| 1.2 – NOVOS MARCADORES DE HIPERGLICEMIA..... | 15 |
| 1.3 – FRUTOSAMINA..... | 18 |
| 1.4 – DOSAGEM LABORATORIAL DA FRUTOSAMINA..... | 19 |
| 1.5 – USO DA FRUTOSAMINA COMO MARCADOR DIAGNÓSTICO DO DIABETES MELLITUS..... | 22 |
| 2 OBJETIVOS | |
| 2.1 – OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| 2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 24 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | |
| 3.1 – DESENHO DO ESTUDO E POPULAÇÃO..... | 25 |
| 3.2 – ANÁLISES BIOQUÍMICAS..... | 26 |
| 3.3 – DEFINIÇÕES DE CASOS..... | 27 |
| 3.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 28 |
| 4 RESULTADOS..... | 29 |
| 5 DISCUSSÃO..... | 44 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 63 |
| 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 64 |
| 8 ANEXO I – PRIMEIRO ARTIGO..... | 71 |
| 9 ANEXO II – SEGUNDO ARTIGO..... | 91 |
| 10 ANEXO III - COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO DO PRIMEIRO ARTIGO..... | 107 |
| 11 ANEXO IV – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO SEGUNDO ARTIGO..... | 109 |
| 12 ANEXO V – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA..... | 111 |

1 – Introdução

1.1 – Considerações Iniciais

O diabetes mellitus (DM) é uma condição definida pela hiperglicemia que leva ao risco de lesão microvascular (retinopatia, nefropatia e neuropatia). Está associada à redução da expectativa de vida, morbidade devido às complicações microvasculares e elevado risco de complicações macrovasculares (doença cardíaca isquêmica, acidente vascular cerebral e doença vascular periférica), além de reduzida qualidade de vida (*WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2006*).

O DM tem sido considerado uma pandemia mundial, com o número de indivíduos diabéticos mais que dobrando nas últimas três décadas. Em 2040, serão mais de 600 milhões de diabéticos em todo o mundo (*INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION - IDF, 2017*). No Brasil, nos últimos 10 anos houve um aumento de 62% nos casos de DM, acometendo cerca de 9,0% da população (*VIGITEL BRASIL, 2016*).

O diagnóstico do DM é baseado na detecção de hiperglicemia laboratorial com ou sem os sinais clássicos descritos como perda de peso inexplicável, poliúria e polidipsia. Atualmente, a glicemia plasmática de jejum (GJ), a glicemia plasmática 2 horas após a sobrecarga oral com glicose (2-h PD) durante o teste de tolerância oral à glicose (TTOG) e a hemoglobina glicada (A1c) são os métodos empregados para diagnóstico do DM. Os critérios para o diagnóstico estão discriminados na tabela 1 (*AMERICAN DIABETES ASSOCIATION -ADA, 2018*).

1.2 – Novos marcadores de hiperglicemia

Recentemente, observa-se um crescente interesse por outros marcadores laboratoriais para o diagnóstico do DM. Esse interesse vem, sobretudo, devido às limitações apresentadas pelos marcadores clássicos (GJ, 2-h PD e A1c) em algumas situações clínicas ou analíticas que poderiam comprometer seu desempenho.

Tabela 1 – Critérios diagnósticos para diabetes mellitus – *American Diabetes Association* (ADA) 2018

GJ \geq 126 mg/dL. Jejum definido como ausência de ingesta calórica por pelo menos 8h.*

OU

2-h PD \geq 200 mg/dL durante TTOG*

OU

A1c \geq 6,5%*

OU

Glicemia \geq 200 mg/dL em pacientes com sintomas de hiperglicemia ou crise

hiperglicêmica

*Na ausência de hiperglicemia inequívoca, os testes devem ser confirmados em uma segunda coleta.

GJ= Glicemia de Jejum, 2-h PD= Glicemia duas horas após dextrosol (75 gramas de glicose anidra), A1c= Hemoglobina Glicada

A GJ ou a 2-h PD são marcadores que refletem o estado da glicose em momentos e condições específicas de coleta. A menor reprodutibilidade desses dois testes é bem conhecida. Cerca de 30% dos indivíduos podem ter uma GJ com níveis inferiores a 126 mg/dL algumas semanas após concentrações iguais ou superiores a 126 mg/dL (SACKS, 2011). Fatores responsáveis por essa variabilidade são conhecidos. A variação biológica da GJ é de 5,7 a 8,3%, considerada elevada se comparada à da hemoglobina glicada (< 1% em indivíduos não diabéticos). Fatores pré-analíticos podem interferir nas concentrações de glicose: tempo inadequado de jejum, exercício, estresse, doença aguda, variação circadiana entre outros. O uso de agentes conservadores (inibição da glicólise *in vitro*) deve ser empregado quando o tempo de centrifugação da amostra for longo. Já o TTOG apresenta grande necessidade de padronização da coleta e baixa reprodutibilidade. Apesar dessas limitações, a glicose continua sendo muito utilizada por ser um método automatizado, largamente disponível e de baixo custo (SACKS, 2011) (BONORA; TUOMILEHTO, 2011).

A introdução da A1c como critério diagnóstico ocorreu após a correlação de seus níveis elevados com a retinopatia diabética (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011). A hemoglobina glicada é o resultado da incorporação da molécula de glicose ao resíduo terminal

N-valina da cadeia beta da hemoglobina, sendo a quantificação reportada como sua proporção em relação à hemoglobina total. A dosagem da A1c oferece algumas vantagens em relação à dosagem da glicemia plasmática de jejum e do TTOG. Não necessita de jejum para sua execução. Fatores como estresse e exercício não alteram sua concentração. Apresenta boa estabilidade pré-analítica, menor variabilidade analítica bem como menor variação biológica. Além disso, a padronização do ensaio de A1c não é inferior ao ensaio da glicose. Grande esforço foi realizado para a padronização dos ensaios de A1c por meio do programa mundial de padronização da hemoglobina glicada (*National Glycohemoglobin Standardization Program – NGSP*) (SACKS, 2011) (BONORA; TUOMILEHTO, 2011). Mesmo após esse processo, contudo, algumas limitações permanecem para a utilização da dosagem da A1c. Sua interpretação depende da vida média das hemácias. Condições que abreviam a duração das hemácias ocasionam redução dos níveis de A1c. Hemoglobinas variantes podem interferir com a leitura do ensaio. Essa interferência depende do tipo de hemoglobina variante, método de dosagem e equipamento utilizado para a dosagem. Anemia ferropriva é associada com concentrações elevadas de A1c. Diferentes taxas de glicação podem proporcionar diferenças entre grupos diferentes com os mesmos valores médios de glicose. A1c tem menor sensibilidade para o diagnóstico do DM em algumas populações fruto das variações étnicas em suas determinações quando correlacionadas com a mesma glicose média (SACKS, 2011, 2013) (BONORA; TUOMILEHTO, 2011) (CAVAGNOLLI, PIMENTEL, FREITAS et al., 2015). Condições clínicas como insuficiência renal crônica e alcoolismo podem afetar seus níveis (DANESE, et al., 2015).

Nesse cenário, outros marcadores de hiperglicemia têm surgido com propostas para utilização no monitoramento do DM, ou mesmo para seu diagnóstico. Frutosamina e albumina glicada (AG) são ambas cetoaminas. São resultados de processo não enzimático de ligação da glicose às proteínas séricas (frutosamina) e albumina exclusivamente (AG). Além da albumina, a frutosamina também é o resultado da glicação de imunoglobulinas e outras proteínas circulantes. Frutosamina e AG refletem a glicemia média em um período inferior ao da A1c. A A1c reflete a glicemia média nos últimos dois a três meses. Frutosamina e AG nas últimas duas a três semanas. O 1,5 anidroglicitol (1,5-AG) é um monossacáride de seis carbonos obtido principalmente de fontes dietéticas. Reflete a glicemia média nos últimos dois a 14 dias. É absorvido quase totalmente pelo túbulo renal em estados de normoglicemia. Entretanto, com níveis elevados de glicemia a glicose compete com o 1,5-AG pela reabsorção no túbulo renal.

Nessa condição, o 1,5-AG é excretado na urina resultando em níveis séricos mais baixos durante estados hiperglicêmicos (PARRINELO; SELVIN, 2014).

No Brasil, o 1,5-AG e a AG não são rotineiramente utilizados, sendo disponíveis em poucos centros. De outra forma, a frutossamina tem sido empregada há longa data no nosso meio, principalmente com a finalidade de monitoramento do tratamento em indivíduos com restrições ao uso da A1c ou para avaliar períodos mais curtos de intervenção terapêutica.

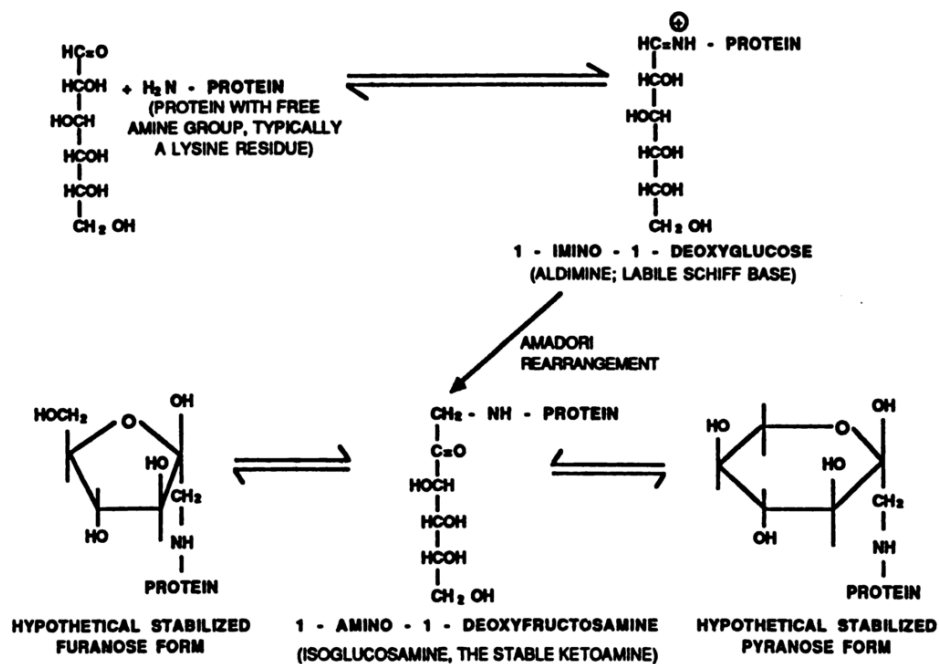
1.3 – Frutosamina

O termo frutosamina foi introduzido na literatura em 1982 como um termo geral para proteína glicada. Foi inicialmente sintetizada em 1886, sendo também denominada 1-amino-1deoxi-frutose ou isoglicosamina. De uma forma mais ampla, a frutosamina é uma cetoamina, um produto derivado de uma reação não enzimática de um açúcar (glicose) e uma proteína. A frutosamina tem origem em uma modificação pós-translacional envolvendo mecanismos não enzimáticos e não deve ser confundida com as glicoproteínas (moléculas cuja adição de carboidrato é realizada de forma enzimática) (AMBRUSTER, 1987).

A reação de aminoácidos e açúcares redutores para formar adutos estáveis de cetoamina foi descrita no início do século XX. É denominada de reação de Maillard, responsável pelo escurecimento de alimentos quando submetidos a temperatura elevada. Grupos carbonila do açúcar combina com o grupo amino da proteína para formar aldimina (Base de Schiff), que evolui para cetoamina estável (frutosamina) por meio do rearranjo de Amadori. A cadeia de frutosamina, formada com a molécula de glicose, sofre uma ciclização para estruturas em anel mais estáveis: furanose ou piranose (AMBRUSTER, 1987). Esse processo é visualizado na figura 1.

A frutosamina reflete a glicação das proteínas séricas. Contudo, a albumina é responsável pela maior proporção dessas proteínas, perfazendo cerca de 60 a 90% da frutosamina. Os principais sítios de glicação da albumina são os resíduos de lisina, em ordem de prevalência Lis 525, Lis 439, Lis 281 e Lis 199 (SCHLEICHER, VOGT, 1990).

Figura 1 – A reação da glicose e proteína para formar frutosamina.



Fonte: AMBRUSTER, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. Clin Chem, v.33, p.2153-2163, 1987.

1.4 – Dosagem laboratorial da frutosamina

Vários métodos foram desenvolvidos para a dosagem laboratorial da frutosamina. Alguns tiveram alguma popularidade no fim do século passado. Contudo, apresentavam problemas analíticos e operacionais, por várias vezes com longo tempo de execução e várias etapas envolvidas, o que não permitia seu uso em larga escala. Merecem menção o procedimento com fenilhidrazina, o procedimento com furosina, a cromatografia de afinidade e o procedimento colorimétrico com ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) (AMBRUSTER, 1987).

No início dos anos 80 houve a primeira publicação com o método atualmente mais utilizado para a dosagem de frutosamina. Na ocasião, o método ainda era manual. Consiste na capacidade da cetoamina (frutosamina) agir como agente redutor em solução alcalina. Essa condição permitiu o desenvolvimento de método colorimétrico simples com a avaliação da absorvância por meio de um espectrofotômetro. As observações preliminares demonstraram que o 1-deoxi,1-morfolinofrutose (DMF), um produto de rearranjo de Amadori sintético, confirmaram sua capacidade de reduzir alguns sais de tetrazólio e, daqueles testados, foi mais reativo com o

nitrobluetetrazólio (NBT). Esse mesmo DMF foi utilizado como o primeiro calibrador do ensaio. Essa reação ocorreu em temperatura ambiente e pH alcalino. Percebeu-se ainda que outras substâncias redutoras poderiam interferir minimamente no ensaio (JOHNSON, METCALF, BAKER, 1982) (SCHLEICHER, et al., 1988). Ainda assim, produtos de rearranjo de Amadori tais como frutossaminas têm atividades redutoras que podem ser diferenciadas de outras substâncias como glicose e derivados N-glicosilaminas de bases de Schiff lábeis, principalmente alterando-se o tempo de incubação (AMBRUSTER, 1987).

Nessa ocasião várias modificações foram avaliadas. A redução do pH do método (de 10,80 para 10,35) permitindo maior amplitude de valores em indivíduos diabéticos e não diabéticos. O padrão DMF utilizando a matriz de albumina bovina e não em albumina sérica humana. No entanto, a matriz de albumina humana foi mantida posteriormente. Potenciais interferentes foram descritos tais como bilirrubina, etilediaminotetracético (EDTA), heparina, cisteína, urato, hemoglobina, cisteína e glutatona. Não obstante, as interferências pareciam ser dependentes de cada analisador utilizado, não sendo necessariamente atribuíveis ao método por si só. Coeficientes de variação foram descritos como até de 5,4% entre laboratórios. O método NBT constituía-se como o método mais importante na ocasião: era rápido, reprodutível e barato, além de facilmente automatizado. Mereceram considerações, contudo, questões relacionadas à melhor forma de calibração e os efeitos da concentração da albumina no ensaio (AMBRUSTER, 1987). O tabagismo eleva as concentrações de frutossamina (SCHWAB, et al, 2008).

A relação entre albumina sérica e a concentração de frutossamina foi avaliada em alguns momentos. Segundo Johnson, Metcalf e Baker (1987, p.151-162), a correlação da albumina com a frutossamina só foi significativa nos pacientes albuminúricos. Concluíram que não havia necessidade da correção automática da concentração de frutossamina pelo valor da albumina. Concluíram, também, que outro método para avaliação do paciente diabético seria necessário em casos de concentração urinária de albumina superior a 1g/L. Outro estudo demonstrou, em contrapartida, menor variabilidade da frutossamina quando coletada ao longo de algumas horas quando corrigida pela concentração das proteínas séricas em indivíduos diabéticos e gestantes (diabéticas e não diabéticas) (FLÜCKIGER, WOODTLI, BERGER, 1987). Alterações no metabolismo da albumina relacionam-se a alterações na concentração da frutossamina em indivíduos com hipertireoidismo ou hipotireoidismo. Aparentemente, concentrações de albumina sérica inferiores a 3 g/dL parecem influenciar a concentração de frutossamina. A

concentração da frutossamina, portanto, deve ser avaliada com cautela em pacientes com alterações do metabolismo da albumina (AMBRUSTER, 1987).

De acordo com Shleicher e Vogt (1990, p.136), o DMF (de baixa massa molecular), previamente introduzido como calibrador do ensaio de frutossamina, possuía propriedades redutoras distintas daquelas da frutossamina sérica fisiológica em amostras humanas. Um novo calibrador passou a ser utilizado. Trata-se da polilisina (*Poly-L-lysine hydrobromide*) de massa molecular de 39 kDa com um conhecido grau de glicação (pelo menos 20%). Os autores também testaram a albumina humana glicada como calibrador. Além da mudança do calibrador, outros reagentes foram modificados como a introdução de uricase e detergentes, eliminando a interferência por matriz proteica, lipemia e ácido úrico. O desempenho de ambos os calibradores testados foi considerado satisfatório quando comparados com a dosagem de frutossamina por outros métodos (frutossina e cromatografia líquida de alta pressão -HPLC). A polilisina foi finalmente escolhida por ser obtida de forma mais prática do que a albumina humana glicada. Intervalo de referência estabelecido em uma população europeia a partir destas modificações no ensaio foi descrito como de 205 a 285 $\mu\text{mol/L}$. Esse intervalo ainda permanece na recomendação de vários fabricantes de kits comerciais como BioSystems (BIOSYSTEMS, 2011) e Roche (ROCHE, 2001). As mudanças realizadas no ensaio NBT e descritas acima passaram a designar o teste como de segunda geração (O'BRIEN, BROOKES, 1999).

Um método enzimático automatizado foi introduzido posteriormente (GlyPro™ - Genzyme Corporation, Cambridge, EUA). Seu princípio consiste na digestão das proteínas séricas por uma proteinase para liberar fragmentos dessas proteínas. Na reação a seguir, uma cetamina oxidase oxida especificamente as ligações entre a glicose e aminoácidos dos fragmentos das proteínas séricas glicadas. Uma reação colorimétrica é usada para determinar a quantidade proteína glicada presente. Este ensaio foi comparado ao método NBT em um analisador automático (Roche). A correlação foi de 0,72. As concentrações de frutossamina foram claramente inferiores às obtidas pelo método NBT (O'BRIEN, BROOKES, 1999). No entanto, esse método não ganhou muita popularidade, sendo registrados poucos estudos clínicos ou analíticos posteriormente empregando seu princípio.

1.5 – Uso da frutossamina como marcador diagnóstico do diabetes mellitus

A A1c reflete a glicose média no período dos últimos dois a três meses. Antes da sua adoção como critério diagnóstico para DM, vários estudos demonstraram, inicialmente, a correlação da hemoglobina glicada com os marcadores glicêmicos até então em uso na população diabética e não diabética (GJ e 2-h PD) e, posteriormente, com o aparecimento de desfechos clínicos específicos, a retinopatia e a microalbuminúria diabéticas (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2011). Após a sua indicação como marcador diagnóstico, vários outros estudos se sucederam, na tentativa de avaliar diferenças nas propriedades diagnósticas da A1c comparada com a GJ e 2-h PD.

Em uma amostra de 14611 indivíduos americanos com idade igual ou superior a 12 anos, a A1c foi capaz de identificar 30% dos indivíduos diabéticos até então não diagnosticados. No entanto, o percentual atribuído à 2-h PD foi significativamente maior, registrando 90% dos indivíduos não diagnosticados. Diferenças raciais e étnicas foram observadas. Indivíduos negros e hispano-americanos apresentavam concentrações mais elevadas de A1c quando comparados aos indivíduos brancos (COWIE, et al., 2010). A inclusão da dosagem de frutossamina como auxílio no manejo do diagnóstico para DM foi avaliada em um grupo de 2877 indivíduos, tendo sido a 2-h PD considerada o padrão-ouro. Nesses indivíduos, uma primeira dosagem de GJ e frutossamina estabeleceu a necessidade da realização do TTOG. A necessidade de realização do TTOG tendo GJ resultado entre 97 e < 126 mg/dL e frutossamina ≥ 235 $\mu\text{mol/L}$ preservaria 85,5% dos testes não diagnósticos. Para a A1c esse percentual seria de 82,6% se GJ entre 101 e < 126 mg/dL e A1c $\geq 5,5\%$. A combinação de GJ e frutossamina com os critérios estabelecidos acima tiveram uma sensibilidade e especificidade superior a 80% para predizer hiperglicemia diagnóstica após sobrecarga (KO, et al., 1998). O estudo de 222 imigrantes africanos que vivem no continente americano demonstrou desempenho diagnóstico (sensibilidade e especificidade) similar para A1c e frutossamina quando o DM foi definido pelo critério de 2-h PD ≥ 200 mg/dL (SUMMER, et al., 2016). Em uma coorte do estudo CARMRI (*Carotid Magnetic Resonance Imaging*), um subestudo do ARIC (*The Atherosclerosis Risk in Communities*), 1299 participantes não diabéticos foram acompanhados por tempo mediano de 3,3 anos. A frutossamina foi associada com o desenvolvimento subsequente de diabetes independentemente dos valores basais de A1c e GJ (JURASCHEK, et al, 2012a).

Algumas particularidades do ensaio de frutossamina tornam seu uso potencial como teste diagnóstico para o DM. O ensaio da frutossamina pode ser realizado em amostras de soro com analisadores de bioquímica, com fácil processo de automação, o que representa uma vantagem operacional e de custo mais reduzido quando comparado ao da A1c (KO, et al., 1998). Exames de A1c são executados em matriz sangue total e necessitam de aparelho dedicado. A variação biológica da frutossamina é estimada em 2,3% (intraindividual) e 2,9% (interindividual) (MONTAGNANA et al., 2013), o que é considerada inferior à da GJ e 2-h PD. A frutossamina expressa a glicose plasmática média das últimas duas semanas, apesar de que períodos de até 30 dias já foram sugeridos (TAHARA, SHIMA, 1995), o que pode expressar um momento diagnóstico diferente dos outros marcadores, e não requer jejum para sua determinação.

As características do ensaio e os estudos desenvolvidos apontam para um papel além do monitoramento do diabetes. Sua correlação com exames clássicos para o DM e seu papel para prever o desenvolvimento do DM faz com que informações sobre o seu desempenho diagnóstico em diferentes populações sejam avaliadas. A frutossamina pode apresentar papel diagnóstico isolado ou complementar aos demais marcadores, bem como apresentar características distintas de utilização em populações com diferenças étnicas e fisiopatológicas. O conhecimento dessas especificidades é importante para analisar o real papel que a frutossamina pode ocupar no diagnóstico do DM. Avaliamos o desempenho da frutossamina como marcador diagnóstico para DM e estabelecemos novos intervalos de referência para a frutossamina.

2 – Objetivos

2.1 – Objetivo Geral

Avaliar o comportamento da dosagem de frutossamina e sua relação com os marcadores laboratoriais tradicionais de diagnóstico de diabetes mellitus na população brasileira, bem como estabelecer um novo intervalo de referência da frutossamina na população brasileira.

2.2 – Objetivos Específicos

- Avaliar a correlação da frutossamina com os testes tradicionalmente utilizados no diagnóstico e acompanhamento do diabetes mellitus (Glicemia de jejum, glicemia 2 horas após sobrecarga de dextrosol e hemoglobina glicada).
- Avaliar a utilidade clínica da frutossamina como teste diagnóstico do diabetes mellitus definido a partir dos outros marcadores disponíveis. Comparar o desempenho da frutossamina com o da A1c para diagnóstico do diabetes mellitus definido pela glicemia de jejum e glicemia 2 horas após sobrecarga de dextrosol.
- Avaliar a influência do sexo, idade, índice de massa corporal (IMC) e cor de pele/raça nos níveis de frutossamina.
- Estabelecer intervalo de referência para frutossamina numa amostra da população brasileira.

3 – Material e Métodos

3.1 - Desenho do estudo e população

Este estudo transversal avaliou um subgrupo de indivíduos de um dos centros participantes do Estudo Longitudinal de Saúde do Adulto (ELSA-Brasil). O ELSA-Brasil foi estabelecido em 2008 como um estudo longitudinal para investigação da incidência e progressão, além dos fatores de risco, para doenças cardiovasculares e diabetes mellitus. Essa coorte incluiu 15105 servidores de instituições de pesquisa e universidades de seis cidades brasileiras de diferentes regiões (Belo Horizonte, Porto Alegre, Rio de Janeiro, Salvador, São Paulo e Vitória). Todos os empregados ativos ou aposentados com idade entre 35 e 74 anos foram considerados elegíveis. Gravidez atual ou nos últimos quatro meses, prejuízo cognitivo ou de comunicação graves, intenção de abandonar o trabalho em um futuro próximo e, se aposentado, ter residência fora da área metropolitana correspondente, foram considerados critérios de exclusão. Todos os voluntários responderam questionário sobre estado de saúde, morbidades, uso de medicamentos, atividade física, consumo de álcool entre outros. Todas as variáveis utilizadas neste estudo fazem parte dos dados coletados na linha de base entre 2008-2010 (SCHMIDT, et al., 2015) (FEDELI, et al., 2013) (AQUINO, et al., 2012).

Os participantes foram entrevistados e examinados de acordo com protocolos padronizados e rigorosamente seguidos nos Centros de Investigação ELSA-Brasil. Pessoas treinadas e certificadas pelo projeto foram responsáveis pelas medidas e exames realizados por profissionais de saúde treinados e também certificados.

Nossa avaliação incluiu indivíduos provenientes de um dos centros participantes (cidade de Belo Horizonte, localizada no Estado de Minas Gerais) em cujas amostras estocadas foi realizada a dosagem de frutamina. Esse centro contou com 3115 participantes. Contudo, para 827 participantes não havia amostras disponíveis. O número total de indivíduos com dosagem de frutamina executada foi de 2288. A população incluída no presente estudo corresponde a uma subamostra da coorte ELSA-Brasil, composta por participantes voluntários, funcionários da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e do Centro Federal de Educação Tecnológico-MG avaliada no Centro de Investigação (CI) ELSA de Minas Gerais (ELSA-MG), situado no Campus Saúde da UFMG, no Anexo Borges da Costa do Hospital das Clínicas (HC)

da UFMG. Todas as informações necessárias para realização do presente projeto estão disponíveis no banco de dados do ELSA.

O protocolo de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética de cada instituição participante. Todos os participantes assinaram o consentimento informado. Mais detalhes sobre o estudo podem ser encontrados em outras referências (SCHMIDT, et al., 2015) (FEDELI, et al., 2013) (AQUINO, et al., 2012).

3.2 - Análises Bioquímicas

Neste trabalho, foram seguidas as recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina laboratorial-SBPC/ML (SBPC/ML, 2005) para coleta de sangue venoso. O participante foi orientado (verbalmente e por escrito) a seguir as seguintes instruções: suspender o uso de polivitamínicos e vitamina C por 24h, realizar jejum de 12 -14 horas, não suspender uso de medicamentos prescritos. A coleta foi realizada pela manhã após o participante confirmar o jejum entre 12 e 14 h, informar uso de medicamentos e presença de doenças selecionadas. A venopunção foi realizada com escalpes para coletas múltiplas de sangue a vácuo e aplicação de torniquete por, no máximo, um minuto. Os tubos de coleta foram identificados com código de barra, permitindo o sigilo no estudo, a segurança para o participante e a garantia da rastreabilidade.

Amostras de sangue foram coletadas após 12h de jejum. O TTOG foi realizado a todos os participantes que desconheciam o diagnóstico de diabetes mellitus. Alíquotas das amostras foram separadas e estocadas em freezers a -80°C em cada um dos seis centros participantes. Todas as análises foram realizadas na Universidade de São Paulo. GJ e 2-h PD foram determinadas pelo método de hexoquinase em analisador automático (ADVIA chemistry; Siemens, Deerfield, IL, USA). A1c foi determinada por cromatografia líquida de alta pressão (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), ensaio certificado pelo *National Glycohemoglobin Standardization Program* (NGSP) (FEDELI, et al., 2013). O laboratório participa do Programa de Proficiência em Ensaios Laboratoriais (PELM/Control-Lab), gerenciado pela SBPC/ML, e do programa de proficiência gerenciado pelo *College of American Pathologists* (CAP). Esses programas, também denominados no Brasil como Controle Externo da Qualidade, permitem avaliar e monitorar a exatidão das medições de um determinado

sistema analítico. O laboratório apresentou desempenho adequado durante todo o presente estudo. A Frutosamina foi dosada pelo método colorimétrico (NBT), baseado na habilidade redutora da frutosamina em uma solução alcalina (BioSystems S.A. Costa Brava, Barcelona, Espanha) em um analisador automático (AU 5800, Beckman Coulter, Estados Unidos) com coeficiente de variação interensaio $\leq 5,3\%$. Amostras de frutosamina congeladas a -20°C e também a -70°C mostraram-se estáveis para sua determinação (KOKINEN, IRJALA, 1988). Essa dosagem foi realizada em um laboratório privado da cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais. Esse laboratório também participa de programas de proficiência externo (PELM/Control-Lab e CAP) e mostra-se com desempenho adequado.

3.3 - Definições de casos

O diagnóstico de diabetes mellitus foi definido de acordo com a *American Diabetes Association* (ADA) como sendo $\text{A1c} \geq 6,5\%$, e/ou $\text{GJ} \geq 126 \text{ mg/dL}$, e/ou $2\text{-h PD} \geq 200 \text{ mg/dL}$ (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018). Também foram relacionados como diabéticos indivíduos que relataram uso de medicamentos para o tratamento de diabetes nas duas últimas semanas ou que já receberam o diagnóstico de diabetes emitido por um médico. Um subgrupo, discriminado como diabetes recente, correspondeu aos indivíduos com os critérios laboratoriais descritos acima, excluindo os pacientes já diagnosticados como diabéticos pelo autorrelato e/ou uso de medicamentos hipoglicemiantes. O grupo de glicemia em jejum alterada foi definido como os portadores de $\text{GJ} \geq 100 \text{ mg/dL}$ e $\text{GJ} < 126 \text{ mg/dL}$. O grupo de alteração da tolerância à glicose incluiu os indivíduos com $2\text{-h PD} \geq 140 \text{ mg/dL}$ e $< 200 \text{ mg/dL}$. A hipertensão arterial sistêmica (HAS) foi definida pelo uso de medicação anti-hipertensiva nas últimas duas semanas ou média de três medidas da pressão arterial sistólica $\geq 140 \text{ mmHg}$ e/ou diastólica $\geq 90 \text{ mmHg}$. O IMC foi obtido dividindo-se o peso, medido em kg, pelo quadrado da altura medida em metros. A medida da circunferência da cintura (circunferência abdominal) foi realizada com a fita inelástica a partir do ponto médio entre a borda superior da crista ilíaca e a última costela, na linha axilar média, com o participante na postura ereta e relaxada. Utilizando a variável cor da pele autorreferida/raça, os participantes foram classificados em negros, pardos, asiáticos, indígenas e brancos (SCHMIDT, et al., 2015) (AQUINO, et al., 2012).

3.4 - Análise estatística

A distribuição normal das variáveis quantitativas foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Variáveis quantitativas com distribuição normal (gaussiana) são apresentadas como média e desvio padrão. Variáveis quantitativas com distribuição não normal (não gaussiana) são apresentadas como mediana e intervalo interquartil. Variáveis qualitativas (nominais/ordinais) são apresentadas como frequências absolutas ou percentual. Eventualmente, intervalo total para as variáveis quantitativas poderá ser utilizado, sendo adequadamente sinalizado. Comparações entre os grupos foram realizadas por meio do teste de Mann-Whitney, teste-t de Student (variáveis quantitativas) ou teste do Qui-quadrado (variáveis qualitativas). O teste de Krsukal-Wallis foi utilizado para comparar três ou mais grupos (variáveis quantitativas). O modelo de regressão linear múltipla foi utilizado para se avaliar a influência de variáveis na concentração de frutossamina. Os pressupostos estatísticos para adequação da regressão linear múltipla foram testados por análise dos resíduos. O coeficiente de correlação de Spearman foi calculado para estabelecer a relação entre as variáveis.

Receiving operator characteristic analyses (ROC) foi realizada e a área sob a curva (AUC) com intervalo de confiança de 95% estimado para determinação do desempenho da frutossamina. O teste de McNemar foi utilizado para comparar o desempenho da frutossamina e A1c no diagnóstico do DM quando realizado pela GJ ou 2-h PD. A distribuição dos percentis para frutossamina, A1c, glicemia de jejum e 2-h PD foram determinados. O intervalo de referência foi construído de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute*, CLSI (CLSI, 2008). Definiu-se o nível de significância de 5%. A análise estatística foi realizada utilizando MedCalc for Windows, versão 18.9 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

4 - Resultados

As características dos participantes do estudo estão apresentadas na Tabela 2. Observamos que os pacientes diabéticos comparados aos não diabéticos eram mais velhos, com maior predomínio do sexo masculino, possuíam IMC mais elevado bem como apresentavam maior prevalência de hipertensão arterial sistêmica (todos $p < 0,001$). Cor da pele/raça autorreferidos foi associada ao diagnóstico de DM ($p < 0,001$). Os marcadores glicêmicos (GJ, 2-h PD, hemoglobina glicada e frutossamina), como esperado, apresentaram concentrações mais elevadas no grupo de diabéticos ($p < 0,001$).

Tabela 2 - Características dos indivíduos participantes do estudo em conjunto e estratificados de acordo com o diagnóstico de diabetes.^a

| | Geral (N=2288) | Sem Diabetes (N=1909) | Diabetes (N=379) ^b | Valor p |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|----------------------------------|------------|
| Idade (anos) | 52 (46-59) | 51 (45-57) | 57 (51-63) | <0,001 |
| Sexo Masculino (%) | 48,3 | 45,9 | 60,7 | <0,001 |
| Cor da pele (%) ^c | | | | <0,001 |
| Branca | 49,4 | 51,2 | 40,7 | |
| Parda | 35,6 | 35,3 | 36,7 | |
| Negra | 12,2 | 10,8 | 19,1 | |
| Outras | 2,8 | 2,7 | 3,5 | |
| IMC (kg/m ²) | 26,0 (23,5-29,1) | 25,6 (23,3-28,4) | 28,3 (25,2-31,1) | <0,001 |
| Hipertensão Arterial (%) | 35,5 | 30,2 | 62,0 | <0,001 |
| Glicemia Jejum (mg/dL) | 105 (98-113) | 103 (97-109) | 132,0 (120-157) | <0,001 |
| A1c % | 5,2 (4,9-5,7) | 5,1 (4,9-5,5) | 6,1 (5,5-7,0) | <0,001 |
| Frutossamina (μmol/L) | 223 (210-237) | 220 (209-233) | 237 (221-258) | <0,001 |
| 2-h PD (mg/dL) ^d | 124 (105-148) | 120 (103-140) | 209 (174-244) | <0,001 |

^aDados apresentados como mediana (intervalo interquartil) ou %.

^bDiabetes definido como qualquer um dos seguintes: A1c $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, glicemia 2h após sobrecarga oral de glicose ≥ 200 mg/dL, autorrelato de diagnóstico de diabetes ou uso de medicamentos para diabetes nos últimos 15 dias.

^cDados disponíveis para 1883 indivíduos sem diabetes e 376 com diabetes (total 2259).

^d2-h PD = Glicemia 2h após sobrecarga oral de glicose. Dados disponíveis para 2081 indivíduos.

A distribuição dos níveis de frutossamina segundo a cor da pele/raça autorreferidos pode ser observada na tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) de acordo com a cor da pele/raça autorreferidos^a.

| | Número | Frutossamina ^b |
|----------|--------|---------------------------|
| Negro | 275 | 226 (213-243) |
| Pardo | 803 | 224 (210-239) |
| Branco | 1117 | 221 (209-234) |
| Asiático | 50 | 227 (212-241) |
| Índio | 14 | 236 (214-251) |

^aDisponíveis para 2259 indivíduos; ^bMediana (intervalo interquartil). $p < 0,001$.

Considerando a cor da pele/raça autorreferidos houve diferença entre os níveis de frutossamina ($p < 0,001$). No entanto, essa diferença foi observada entre negros, pardos, asiáticos em comparação com os brancos ($p < 0,05$). Concentrações de frutossamina no grupo autorreferido como índio foi similar a todos os outros ($p > 0,05$). Foram constituídos, assim, dois grupos: brancos e não brancos. Níveis de frutossamina foram mais elevados na população não branca, mesmo quando estratificados pela presença ou ausência do diagnóstico de diabetes (tabela 4).

Tabela 4 – Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$)^a na população branca e não branca estratificados de acordo com o diagnóstico de diabetes mellitus.

| | Branca | Não Branca |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Todos ^b | 221 (209-234) (n=1117) | 225 (211-240) (n=1142) |
| Não diabéticos ^c | 219 (218-221) (n=964) | 222 (220-224) (n=919) |
| Diabéticos ^d | 234 (218-253) (n=153) | 240 (223-268) (n=223) |

^aMediana (intervalo interquartil); ^b $p < 0,001$; ^c $p = 0,002$; ^d $p = 0,036$

Níveis de hemoglobina glicada também foram mais elevados na população não branca ($p < 0,001$). A concentração de 2-h PD não apresentou diferença entre a população branca e não branca ($p = 0,101$). A GJ foi mais elevada na população não branca quando considerado o grupo total de indivíduos ($p = 0,008$). No entanto, estratificado entre os grupos com ($p = 0,48$) e sem diabetes ($p = 0,11$), não houve diferença significativa. A frutossamina apresentou-se mais elevada no grupo não branco, mesmo quando comparada no grupo de indivíduos nos quais todos os

critérios dos marcadores glicêmicos (glicemia de jejum < 100 mg/dL, 2-h PG < 140 e A1c < 5,7%) encontravam-se normais simultaneamente (p=0,003).

O sexo masculino apresentou níveis de frutossamina mais elevados nos grupos com e sem diabetes (p=0,001 e p<0,001, respectivamente) e também no grupo de indivíduos sem nenhuma alteração nos marcadores glicêmicos (p<0,001) (Tabela 5).

Tabela 5 – Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) no sexo masculino e feminino segundo diagnóstico ou não de diabetes mellitus.

| | Sexo Feminino ^a | Sexo Masculino ^a |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Geral | 218 (206-231) | 228 (215-244) ^c |
| Não diabéticos | 216 (205-228) | 225 (213-239) ^c |
| Diabéticos | 232 (218-252) | 243 (225-272) ^d |
| Testes normais ^b | 215 (205-227) | 226 (214-238) ^c |

^aMediana (intervalo interquartil); ^bGJ < 100 mg/dL e 2-h PD <140 e A1c < 5,7% simultaneamente. ^cp<0,001; ^dp=0,001

Indivíduos com IMC $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ apresentaram níveis de frutossamina mais baixos do que indivíduos com níveis de IMC < 30 kg/m^2 (p=0,008). Relações entre a concentração de frutossamina com o IMC podem ser avaliadas na tabela 6.

Tabela 6 – Concentração de frutossamina ($\mu\text{mol/L}$)^a de acordo com a estratificação do IMC em indivíduos diabéticos e não diabéticos.

| IMC (kg/m^2) | Todos | Não Diabéticos | Diabéticos ^d |
|-------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| <25 | 224 (211-237) ^b | 223 (211-236) ^c | 235 (224-252) ^d |
| ≥ 25 a < 30 | 223 (210-238) | 220 (209-233) | 243 (225-264) |
| ≥ 30 | 218 (207-234) | 215 (203-226) | 236 (217-260) |

^aMediana (intervalo interquartil); ^bp=0,003 (diferença dos grupos < 25 e 25 a 30 com $\geq 30 \text{ kg/m}^2$); ^cp<0,001 (significativo entre as três classes entre si); ^dp=0,329

A frutossamina apresentou correlação negativa com o IMC (r=-0,08;p<0,001). Essa correlação foi significativa nos indivíduos não diabéticos (r=-0,16;p<0,001) e ausente nos indivíduos diabéticos (r=-0,03;p=0,562). A A1c apresentou correlação positiva com o IMC (r=0,21;p<0,001) no grupo total de participantes. Mas assim como a frutossamina, essa correlação foi significativa apenas no grupo sem diabetes (r=0,14; p<0,001). Nos indivíduos diabéticos, a correlação foi estatisticamente não significativa (r=0,09; p=0,082). GJ e 2-h PD

apresentaram correlações significativas e positivas no grupo total de indivíduos e também nos grupos de indivíduos diabéticos e não diabéticos.

A frutossamina apresentou correlação com a idade quando analisados conjuntamente diabéticos e não diabéticos ($r=0,09$; $p<0,001$), mas não houve correlação quando essa população foi restrita aos indivíduos não diabéticos ($r=0,04$; $p=0,106$) ou diabéticos ($r=-0,04$; $p=0,475$).

As correlações, no grupo total de indivíduos, entre a frutossamina e GJ ($r=0,26$; $p<0,001$) e entre frutossamina e A1c ($r=0,22$; $p<0,001$) foram semelhantes entre si, mas superiores à correlação entre frutossamina e 2-h PD ($r=0,10$; $p<0,001$). Todas essas correlações mantiveram-se significativas quando avaliadas segundo cor da pele/raça autorreferida (branca x não branca) e sexo. A única exceção foi a correlação entre frutossamina e 2-h PD em mulheres ($r=0,04$; $p=0,166$). A correlação entre A1c e GJ, e entre A1c e 2-h PD foram $r=0,37$ ($p<0,001$) e $r=0,23$ ($p<0,001$) respectivamente. Já entre a GJ e 2h- PD a correlação foi de $r=0,49$ ($p<0,001$). As correlações foram maiores na população não branca quando comparada à branca.

As correlações obtidas entre a frutossamina e GJ no grupo de indivíduos com diagnóstico de diabetes autorreferido foi de 0,68 ($p<0,001$). Para aqueles com diagnóstico de diabetes detectado no estudo (diabetes recente), a correlação foi 0,47 ($p<0,001$). As correlações da frutossamina com A1c para ambos os grupos foram respectivamente 0,74 ($p<0,001$) e 0,19 ($p=0,006$). A correlação da glicemia de jejum e A1c nesses grupos foi de 0,71 ($p<0,001$) e 0,23 ($p<0,001$), respectivamente. A correlação da frutossamina com 2-h PG foi 0,28 ($p<0,001$), mas significativa apenas no grupo diagnosticado com DM após o TTOG.

Nos grupos especificados como pré-diabéticos, a correlação entre frutossamina e GJ no grupo com glicemia em jejum alterada (≥ 100 e < 126 mg/dL), em 1380 indivíduos, foi $r=0,09$ ($p<0,001$). Nesse mesmo grupo, a correlação entre A1c e glicemia de jejum foi $r=0,15$ ($p<0,001$) e entre frutossamina e A1c $r=0,07$ ($p=0,014$). Contudo, no grupo de alteração da tolerância à glicose, definido como 2-h PG ≥ 140 mg/dL e < 200 mg/dL, a frutossamina e a 2-h PD apresentaram correlação $r=0,13$ ($p=0,003$). A correlação da A1c e 2-h PD foi também significativa, $r=0,10$ ($P<0,017$). Nesse grupo de alteração da tolerância à glicose a correlação entre frutossamina e A1c foi $r=0,09$ ($p=0,040$).

A função quadrática foi avaliada como alternativa ao modelo linear para as correlações da frutossamina com a A1c e GJ. A relação entre as variáveis distanciou-se da linearidade evidenciado pelo teste de Cusum: $p=0,03$ e $p<0,001$, respectivamente para as correlações entre

frutosamina e A1c e entre frutosamina e GJ. O uso da função quadrática aumentou o coeficiente de determinação para ambas as associações, de 0,30 para 0,41 (com A1c) e de 0,38 para 0,54 (com a GJ). Nesse estudo, avaliando-se todos os indivíduos envolvidos, o valor de 126 mg/dL para a GJ correspondeu ao percentil 88. No caso da A1c, o percentil 92 correspondeu ao valor de 6,5%. Finalmente, o percentil 93 foi o relacionado ao valor de 2-h PG de 200 mg/dL. Os equivalentes desses percentis, na concentração da frutosamina, foram respectivamente: 251 $\mu\text{mol/L}$, 257 $\mu\text{mol/L}$ e 259 $\mu\text{mol/L}$. A figura 2 mostra os gráficos de correlação da frutosamina com os testes clássicos para hiperglicemia.

Quatro critérios foram criados para avaliar o desempenho da frutosamina como marcador diagnóstico para o DM. Em todos eles, apenas os casos diagnosticados recentemente foram selecionados, sendo excluídos os pacientes com diagnóstico já estabelecido de diabetes. Características dos dois grupos podem ser visualizadas na tabela 7. Indivíduos com diabetes autorreferido são mais velhos ($p < 0,001$), têm maior prevalência de HAS ($p = 0,009$), e possuem concentrações mais elevadas de glicemia de jejum, hemoglobina glicada e frutosamina (todos $p < 0,001$). As distribuições de sexo, IMC e cor de pele/raça autorreferidos não foram estatisticamente significativas.

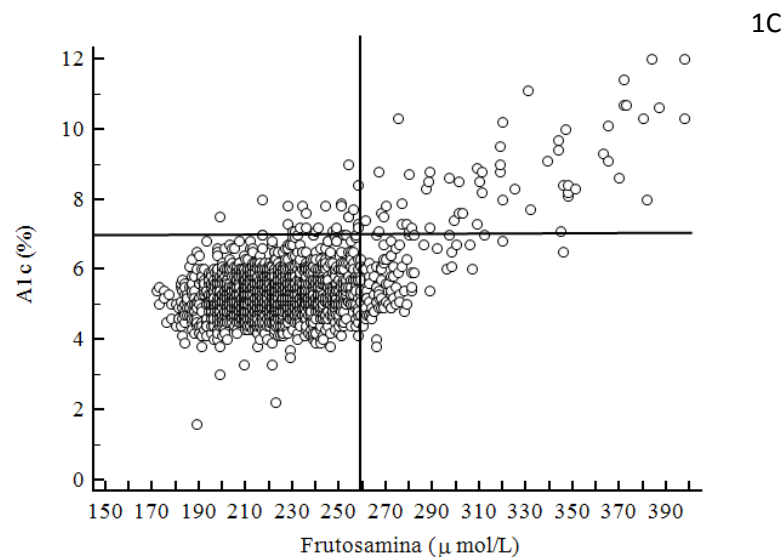
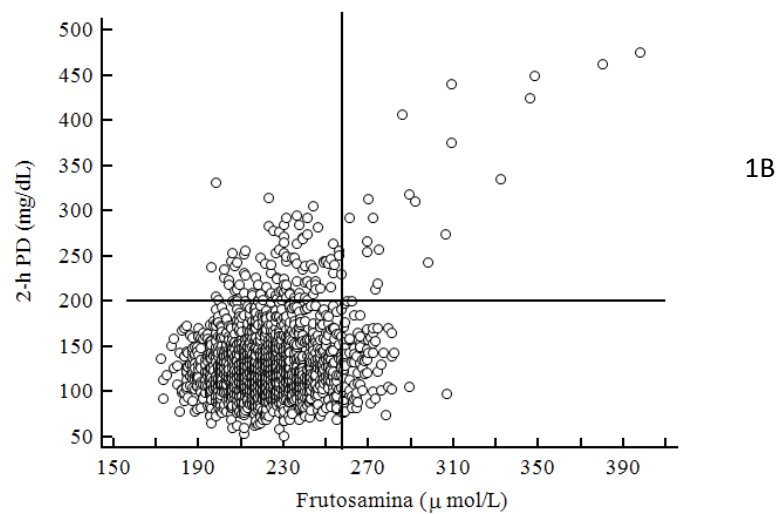
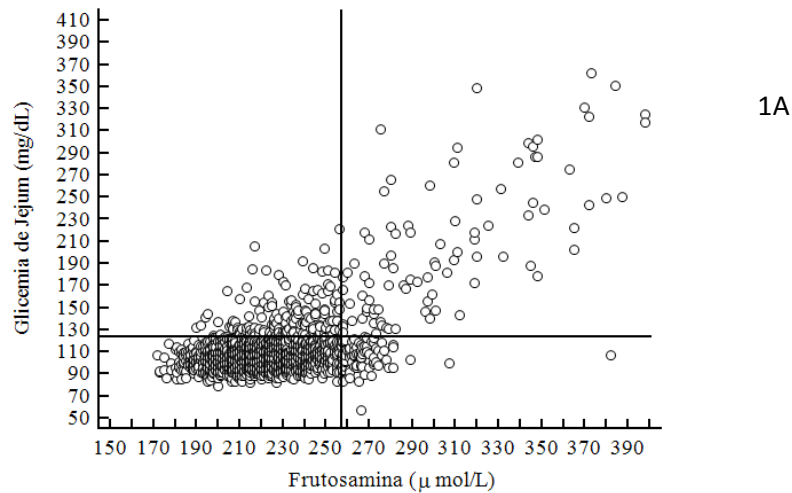
Tabela 7 - Características dos indivíduos diabéticos autorreferidos e aqueles com diagnóstico recente.^a

| | Diabetes Autorreferido ^b (N=161) | Diabetes Recente (N=218) ^c |
|------------------------------------|--|--|
| Idade (anos) | 58 (53-64) | 55 (49-62) |
| Sexo Masculino (%) | 60,6 | 60,9 |
| Cor da pele autorreferida/Raça (%) | | |
| Branca | 44,2 | 35,8 |
| Não Branca | 55,8 | 64,2 |
| IMC (kg/m^2) | 25,2 (25,6-31,5) | 28,3 (25,0-31,0) |
| Hipertensão Arterial (%) | 69,6 | 56,4 |
| Glicemia Jejum (mg/dL) | 157 (128-193) | 128 (116-137) |
| A1c % | 6,8 (6,0-7,8) | 5,9 (5,4-6,5) |
| Frutosamina ($\mu\text{mol/L}$) | 251 (229-287) | 231 (218-247) |

^aDados apresentados como mediana (intervalo interquartil) ou %. A1c, hemoglobina glicada. 2-h PD, glicose duas horas após sobrecarga de dextrosol. ^bAutorrelato de diagnóstico de diabetes ou uso de medicamentos para diabetes nos últimos 15 dias. ^cDiabetes recente definido

como qualquer um dos seguintes: A1c $\geq 6,5\%$, glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL, glicemia 2h após sobrecarga oral de glicose ≥ 200 mg/dL.

Figura 2 – Correlação entre frutossamina e glicemia de jejum (1A), 2h-PD (glicose 2h após sobrecarga de destrosol) (1B) e hemoglobina glicada (A1c) (1C) no grupo total de indivíduos. As linhas representam o valor de corte para cada teste utilizado neste estudo.



Os critérios diagnósticos foram designados por grupos. Grupo 1 corresponde ao diagnóstico de diabetes a partir de qualquer um dos testes alterados: GJ \geq 126 mg/dL, 2-h PD \geq 200 mg/dL e A1c \geq 6,5%. O grupo 2 tem como critério diagnóstico apenas a GJ \geq 126 mg/dL. O grupo 3 é identificado pelos indivíduos com a 2-h PD \geq 200 mg/dL. Por fim, no grupo 4, o critério é A1c \geq 6,5%. As áreas sob a curvas (AUC, do inglês *Area Under the Curve*) ROC (*Receiver Operating Characteristic*) da frutossamina e dos demais marcadores estão discriminados na Tabela 8.

Tabela 8 – Desempenho da frutossamina e demais testes (AUC e intervalo de confiança de 95%) em cada uma das definições de novos casos de diabetes (grupos 1 a 4). Participantes com relato de diagnóstico de diabetes prévio foram excluídos da análise.

| | Grupo 1 ^a (n=2124) | Grupo 2 ^b (n=2124) | Grupo 3 ^c (n=2079) | Grupo 4 ^d (n=2124) |
|---------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Frutossamina | 0,66 (0,64-0,68) | 0,74 (0,72-0,76) | 0,68 (0,66-0,70) | 0,70 (0,68-0,72) |
| Glicemia Jejum | - | - | 0,88 (0,86-0,89) | 0,84 (0,83-0,86) |
| 2-h PD ^e | - | 0,90 (0,89-0,91) | - | 0,80 (0,78-0,82) |
| A1c | - | 0,78 (0,76-0,80) | 0,75 (0,73-0,76) | - |

^aQualquer um dos valores: GJ \geq 126 mg/dL; 2-h PD \geq 200 mg/dL; A1c \geq 6,5%.

^bGJ \geq 126 mg/dL.

^c2h- PD \geq 200 mg/dL.

^dA1c \geq 6,5%.

No grupo de pacientes diagnosticados pela GJ, a AUC da 2-h PD foi superior à da frutossamina ($p < 0,001$). No entanto, o desempenho da A1c foi comparável ao da frutossamina ($p = 0,208$). Para o grupo de diabetes definido com a 2-h PD, a diferença de desempenho foi superior para a GJ ($p < 0,001$) e similar (limítrofe) para A1c ($p = 0,053$) quando comparados ao da frutossamina. No grupo de pacientes definidos como A1c \geq 6,5%, a GJ foi superior à frutossamina ($p = 0,006$). Já a diferença entre a frutossamina e a 2-h PD não atingiu significância estatística ($p = 0,064$).

A tabela 9 mostra as sensibilidades e especificidades alcançadas pela frutossamina e A1c quando o diabetes foi definido pela GJ e pela 2-h PD. O valor de corte da frutossamina escolhido para essa análise foi de 257 $\mu\text{mol/L}$, concentração intermediária dos percentis encontrados no estudo (percentil 92). Para ambas as definições, os desempenhos da frutossamina e hemoglobina glicada foram semelhantes ($p=0,572$ e $p=0,308$, respectivamente).

Tabela 9 – Sensibilidade e especificidade (IC95%) da frutossamina (valor de corte 257 $\mu\text{mol/L}$) e A1c (valor de corte 6,5%) nos pacientes diagnosticados pela glicemia de jejum e 2-h PD. Participantes com diagnóstico prévio de diabetes foram excluídos da análise.

| Diagnóstico definido como glicemia de jejum ≥ 126 mg/dL | | |
|--|-------------------|--------------------|
| | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) |
| Frutossamina | 22,8 (15,9-31,1) | 95,8 (94,8-96,6) |
| A1c | 22,8 (15,9-31,1) | 99,2 (98,6-99,5) |
| Diagnóstico definido como 2-h PD ≥ 200 mg/dL | | |
| Frutossamina | 16,4 (10,6-23,8) | 95,5 (94,5-96,4) |
| A1c | 18,7 (12,5-26,3) | 99,0 (98,5-99,4) |

A1c, hemoglobina glicada; 2-h PD, glicose 2h após sobrecarga de dextrosol, IC95%- intervalo de confiança

Utilizando o valor de corte usual da A1c para diagnóstico de diabetes ($\geq 6,5\%$) e o de frutossamina estabelecido nesse estudo ($> 257 \mu\text{mol/L}$) avaliamos os indivíduos no grupo total diagnosticados pela A1c e não pela frutossamina ($n=76$) e vice-versa ($n=112$). As distribuições das variáveis investigadas estão discriminadas na figura 3. Os indivíduos diagnosticados pela frutossamina, e não pela A1c, possuem IMC mais baixo e são mais jovens e possuem menor circunferência abdominal. A proporção de hipertensos no grupo diagnosticado pela frutossamina foi de 50% contra 59,2% no grupo dos indivíduos diagnosticados pela A1c. Essa diferença não atingiu significância estatística ($p=0,216$).

A sensibilidade e especificidade da frutossamina para o diagnóstico do diabetes foram avaliadas a partir dos pontos sugeridos pela curva ROC para os quatros critérios adotados nesse estudo (Tabela 10).

Tabela 10 - Sensibilidade e especificidade da frutossamina (e o respectivo intervalo de confiança de 95%) no diagnóstico do diabetes de acordo com os pontos de corte sugeridos pela curva ROC.

| | Group 1 ^a (n=2124) | Group 2 ^b (n=2124) | Group 3 ^c (n=2079) | Group 4 ^d (n=2124) |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Sensibilidade ^e | 62,2 (55,4-68,7) | 74,8 (66,3-82,1) | 67,2 (58,5-75,0) | 45,8 (32,7-59,2) |
| Especificidade ^e | 63,5 (61,2-65,6) | 60,4 (58,2-62,5) | 62,5 (60,3-64,7) | 87,1 (85,5-88,5) |

Participantes com diabetes autorreferido e/ou uso de insulina e medicamentos hipoglicemiantes foram excluídos da análise.

^aQualquer um dos valores: GJ \geq 126 mg/dL; 2-h PD \geq 200 mg/dL; A1c \geq 6,5%.

^bGJ \geq 126 mg/dL.

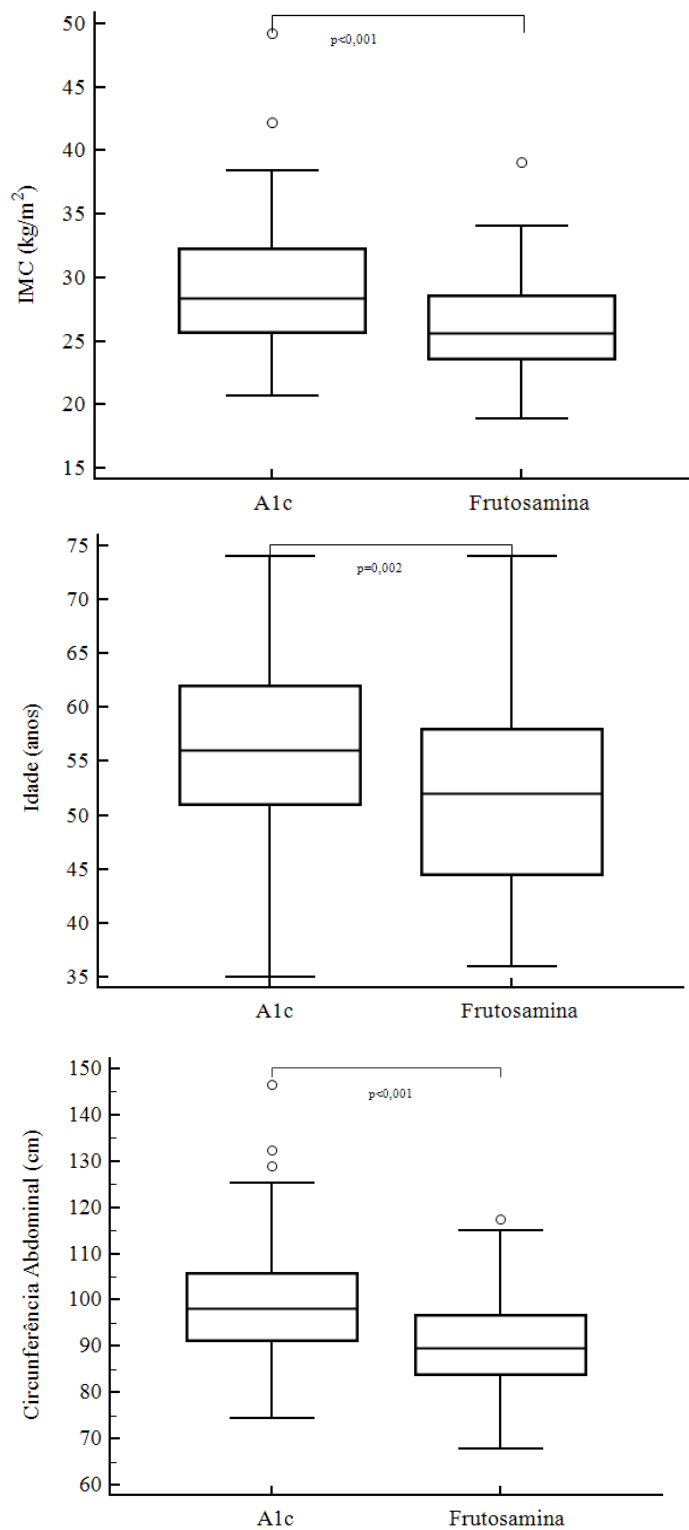
^c2h- PD \geq 200 mg/dL.

^dA1c \geq 6,5%.

^eValores de corte da frutossamina (μ mol/L): 226 (grupos 1 e 3), 244 (grupo 4) e 225 (grupo 2)

O número total de participantes para a determinação do intervalo de referência foi de 466. A influência dos fatores de exclusão na construção do número final de indivíduos pode ser visualizada na figura 4. O critério de exclusão de diabetes mellitus autorreferido não teve nenhum efeito no algoritmo após a utilização dos três primeiros critérios. As características dos participantes do estudo se encontram na tabela 11. Em relação ao sexo, a idade foi maior no grupo feminino. Contudo não houve diferença quanto à distribuição da cor de pele autorreferida e IMC segundo sexo. Não houve diferença estatística entre os níveis de frutossamina quando estratificados pela cor de pele autorreferida ($p=0,185$). No entanto, ao estratificarmos em população branca e não branca, níveis de frutossamina foram mais elevados na população não branca ($p=0,034$). Homens apresentaram concentrações mais elevadas de frutossamina do que as mulheres ($p<0,001$). Os valores de frutossamina apresentaram correlação negativa com IMC ($r=-0,117$, $p=0,011$). O modelo de regressão múltipla linear foi utilizado para discriminar variáveis que pudessem influenciar na geração do intervalo de referência da frutossamina.

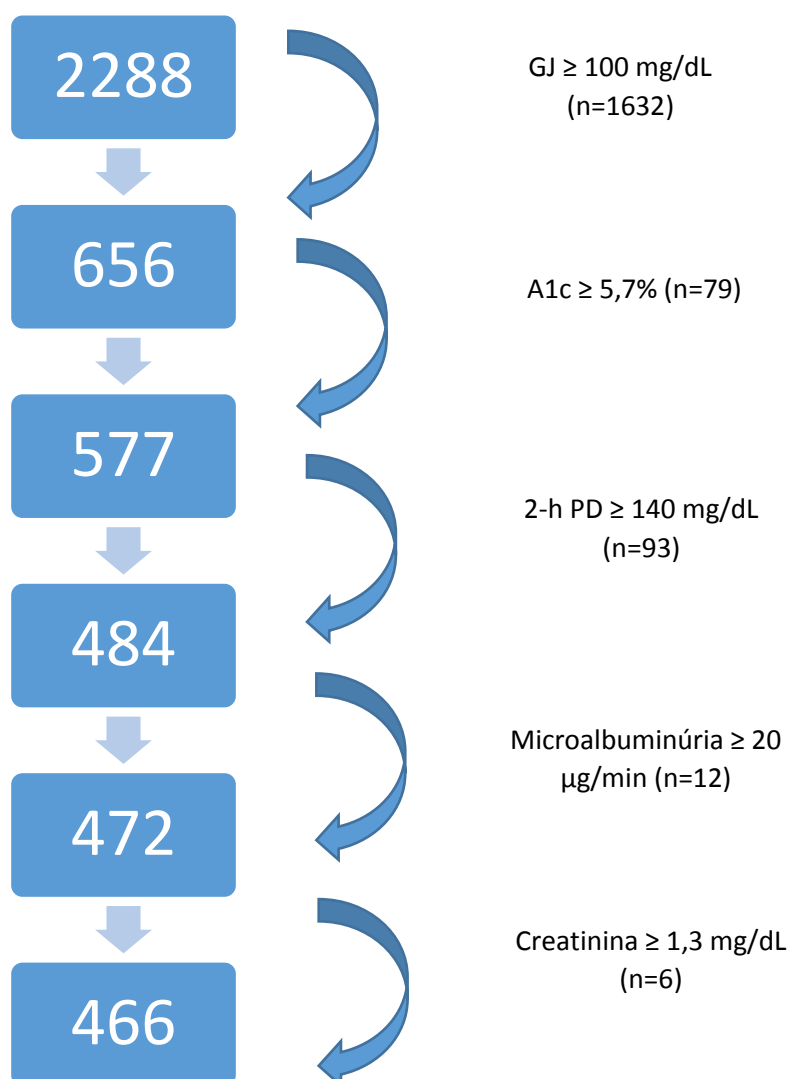
Figura 3 – Características dos indivíduos diagnosticados pela frutosemina ($\geq 257 \mu\text{mol/L}$; $n=112$) ou A1c ($\geq 6,5\%$; $n=76$) de acordo com o IMC, a idade e a circunferência abdominal.



Gráficos Box-Plot: as extremidades dos retângulos representam os percentis 25 e 75. A linha dentro do retângulo a mediana. As semirretas ligam respectivamente os percentis 25 ao valor mínimo e o percentil 75 ao valor máximo. Circunferências nas extremidades representam *outliers*.

Apesar da idade não ter apresentado correlação significativa com a concentração de frutamina ($r=0,05$, $p=0,323$), ela foi incluída no modelo de regressão múltipla. As outras variáveis (sexo, cor da pele/raça autorreferida, IMC foram incluídas no modelo). O ajuste do modelo foi avaliado por meio da análise dos resíduos.

Figura 4 – Algoritmo do número final de participantes do estudo de intervalo de referência.



O modelo de regressão múltipla linear (*stepwise*) foi significativo ($p < 0,001$, coeficiente de correlação ajustado de 0,108) e manteve como variáveis significativas sexo, cor da pele autorreferida e IMC. Variáveis foram incluídas no modelo se $p < 0,05$, e removidas se $p > 0,10$. A variável idade não apresentou significância no modelo. As características da equação desse modelo estão discriminadas na tabela 12.

A pesquisa de *outliers* demonstrou a presença de cinco *outliers* de Tukey e nenhum de Reed/Dixon. Os *outliers* de Tukey não foram excluídos após análise de sua distribuição em gráfico Box-Plot (figura 5).

Figura 5 – Distribuição dos 466 indivíduos participantes do estudo para confecção do intervalo de referência para frutosamina.

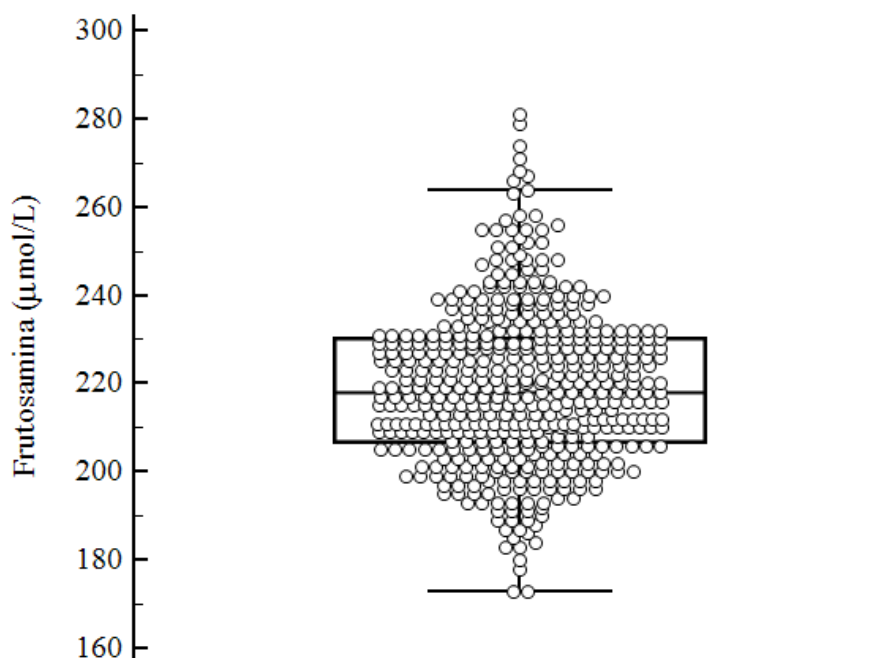


Gráfico Box-Plot: as extremidades dos retângulos representam os percentis 25 e 75. A linha dentro do retângulo a mediana. As semirretas ligam respectivamente os percentis 25 ao valor mínimo e o percentil 75 ao valor máximo. Circunferências fora das extremidades representam *outliers*.

Tabela 11 – Características laboratoriais e clínicas da população final para geração do intervalo de referência, linha de base do ELSA-Brasil para a construção do intervalo de referência (n=466)

| | Total | Masculino | Feminino | Valor-p |
|---------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------|
| N ^a | 466 | 145 (31,1) | 321 (68,9) | |
| Idade (anos) ^a | 48 (43-56) | 47 (42-54) | 49 (44-56) | 0,006 |
| Cor de pele ^b | | | | 0,240 |
| Negro | 40 (8,6) | 9 (6,2) | 31 (9,7) | |
| Pardo (Brown) | 166 (35,6) | 59 (40,7) | 107 (33,3) | |
| Branco | 243 (52,1) | 73 (50,3) | 170 (53,0) | |
| Outros ^c | 12 (2,6) | 2 (1,4) | 10 (3,1) | |
| IMC (kg/m ²) ^b | | | | 0,853 |
| < 25 | 284 (60,9) | 91 (62,8) | 193 (60,1) | |
| 25 a < 30 | 143 (30,7) | 42 (29,0) | 101 (31,5) | |
| ≥ 30 | 39 (8,4) | 12 (8,3) | 27 (8,4) | |
| Frutosamina ^a | 218 (207-230) | 226 (215-238) | 215 (205-207) | <0,001 |
| GJ (mg/dL) ^a | 96 (92-97) | 96 (94-97) | 96 (92-97) | 0,017 |
| 2-h PD (mg/dL) ^a | 106 (94-117) | 104 (94-117) | 106 (94-117) | 0,542 |
| A1c (%) ^a | 5,0 (4,7-5,3) | 5,0 (4,7-5,3) | 5,0 (4,7-5,3) | 0,763 |
| Creatinina | 0,90 | 1,00 | 0,80 | <0,001 |
| (mg/dL) ^a | (0,80-1,00) | (0,90-1,10) | (0,70-0,90) | |
| Microalbuminúria | 0,093 | 0,094 | 0,093 | <0,001 |
| (µg/min) ^a | (0,092-0,097) | (0,093-0,102) | (0,092-0,095) | |

^aMediana e intervalo interquartil; ^bFrequência absoluta (%);; ^cAsiáticos e indígenas; IMC= Índice de Massa Corporal; GJ = Glicemia de Jejum; 2-h PD = Glicose 2h após dextrosol; A1c = Hemoglobina Glicada.

Tabela 12 - Modelo de regressão linear múltipla para a variável dependente frutossamina.

| Variáveis Independentes | Coefficiente | Erro padrão | r parcial | Estatística t | Valor p |
|---|--------------|-------------|-----------|---------------|---------|
| (Constante) | 230,6859 | | | | |
| IMC (kg/m ²) | -0,6741 | 0,2144 | -0,1455 | -3,144 | 0,0018 |
| Sexo (masculino) | 10,6929 | 1,6707 | 0,2868 | 6,400 | <0,0001 |
| Cor da pele/raça autorreferida (não branca) | 3,8728 | 1,5608 | 0,1153 | 2,481 | 0,0134 |

As variáveis sexo, IMC (< 25 Kg/m² e ≥ 25 Kg/m²) e cor de pele autorreferida/raça (branca e não branca) foram avaliadas separadamente segundo critérios de Harris-Boyd (CLSI) (Harris, Boyd, 1990) para a estratificação dos intervalos de referência. Apenas a variável sexo apresentou critérios para estratificação dos seus intervalos de referência. Após a separação dos grupos em masculino e feminino, as variáveis IMC e cor de pele/raça autorreferida foram novamente avaliadas separadamente para o sexo masculino e feminino, e não foram significativas para nova estratificação.

A avaliação para o IMC ocorreu após transformação logarítmica dos dados, haja vista a presunção da distribuição normal dos grupos para aplicação dos critérios de Harris-Boyd (Lahti et al., 2004). Para os demais parâmetros não houve necessidade de transformação dos dados. A definição dos grupos para o IMC ocorreu como < 25,0 kg/m² e ≥ 25 kg/m². O número de indivíduos com IMC igual ou superior a 30,0 kg/m² foi apenas de 39, impedindo a geração de intervalos de referência com razoáveis intervalos de confiança.

Os intervalos de referência gerados nesse estudo estão dispostos na tabela 13, com seus respectivos intervalos de confiança.

Tabela 13 – Intervalos de referência (95%) para frutossamina ($\mu\text{mol/L}$) gerados a partir da população de um dos centros (Belo Horizonte) participantes do estudo ELSA-Brasil

| | Limite Inferior | Limite Superior |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| Sexo Feminino (n=321) | 186 (IC: 183-189) | 248 (IC: 243-255) |
| Sexo Masculino (n=145) | 197 (IC: 178-199) | 269 (IC: 263-279) |
| Combinado (n=466) | 188 (IC: 183-191) | 257 (IC: 255-267) |

IC, Intervalo de Confiança de 90%.

5 – Discussão

Neste estudo transversal, a relação da frutossamina com os marcadores clássicos para diagnóstico do diabetes em uma subpopulação brasileira foi avaliada. Um intervalo de referência para a população brasileira também foi gerado a partir dos dados disponíveis de um dos centros do Estudo Longitudinal do Adulto, ELSA-Brasil.

A frutossamina apresentou correlações significativas com todos os marcadores de diagnóstico para diabetes já estabelecidos: GJ, 2-hPD e A1c. A correlação com 2-h PD foi inferior à associação estabelecida com os dois outros marcadores. A frutossamina apresentou desempenho diagnóstico significativo quando o diabetes foi definido pelos outros testes já utilizados para essa finalidade.

Utilizando critérios para diagnóstico do diabetes diferentes dos atuais, um grupo de pesquisadores avaliaram 302 adultos no Japão que foram categorizados como “diabéticos limítrofes” (2-h PD \geq 140 mg/dL, n=123) ou diabéticos (GJ \geq 140 mg/dL e/ou 2-h PD \geq 200 mg/dL; n=49) de acordo com o critério adotado pela Organização Mundial de Saúde de 1980 (Shima et al., 1989). A correlação da frutossamina com a GJ foi de 0,79 no grupo de indivíduos cujos resultados de GJ \geq 140 mg/dL. Ao utilizarmos essa estratificação no presente trabalho, a correlação com a GJ foi de 0,69 ($p < 0,001$; n=151). Na população japonesa, a correlação da GJ $<$ 140 mg/dL com a frutossamina foi de $r=0,26$. Com esse critério, observamos correlação de $r=0,15$ na população do ELSA-Brasil utilizada neste trabalho ($p < 0,001$; n=2137). Ainda com os resultados obtidos com os voluntários do ELSA-Brasil, observamos a correlação da frutossamina com a 2-h PD igual ou acima de 200 mg/dL de $r=0,41$ ($p < 0,001$; n=129). No trabalho de Shima et al. (1989), esse valor foi de $r=0,71$. Esse mesmo grupo de autores encontraram correlações de A1c mais elevadas com a GJ quando comparadas com a frutossamina com os três critérios criados: $r=0,83$, $r=0,44$ e $0,83$, respectivamente quando GJ \geq 140 mg/dL, GJ $<$ 140 mg/dL e 2-h PD \geq 200 mg/dL. O método para dosagem da frutossamina foi discriminado como “comercial” e executado em um analisador Cobas Mira. Possivelmente trata-se do método NBT, porém com calibrador ainda da primeira geração (DMF).

A partir de uma coorte americana, *The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC)*, dois trabalhos discutiram o papel da frutossamina no diagnóstico do diabetes mellitus. O estudo ARIC é uma coorte que arrolou 15792 indivíduos adultos oriundos de quatro comunidades americanas entre os anos de 1987 e 1989. Esses indivíduos foram acompanhados por mais de duas décadas.

As avaliações clínicas dos participantes desse estudo aconteciam a cada três anos aproximadamente.

O estudo CARMRI (do inglês *Carotid Magnetic Resonance Imaging*) avaliou 1719 indivíduos, um subgrupo da coorte ARIC. Esses indivíduos foram arrolados entre os anos de 2004 e 2005. Dois terços dos participantes possuíam maior espessura média da camada íntima da artéria carótida. O outro terço foi selecionado aleatoriamente do restante dos participantes do ARIC. Os 1719 indivíduos com resultados de GJ, A1c, frutossamina, albumina glicada e 1,5-AG participaram de estudo transversal com avaliação do teste de frutossamina para o diagnóstico de DM (JURASCHECK, STEFFES, SELVIN, 2012). Esse trabalho adotou as definições de DM idênticas ao da população ELSA-Brasil. As correlações encontradas nas diferentes subpopulações no estudo de Juraschek, Steffes e Selvin (2012) comparadas àquelas estabelecidas na população brasileira podem ser vistas na tabela 14.

As correlações encontradas no estudo de Juraschek, Steffes e Selvin (2012) são via de regra mais elevadas do que aquelas encontradas na população brasileira. Os indivíduos incluídos no estudo americano eram mais velhos (média de idade de 70,3 anos contra 52,3 anos) e com níveis mais elevados de A1c (5,8% contra 5,4%). Assim como na população brasileira, a correlação da frutossamina com A1c e GJ foram maiores na população negra. Particularmente no Brasil, esse grupo foi definido como cor da pele/raça não branca. Entretanto, a correlação entre esses testes foi superior para o sexo masculino entre os americanos, fato não evidenciado nos brasileiros. A correlação para os indivíduos diabéticos foi maior na população brasileira entre frutossamina e A1c, bem como entre frutossamina e GJ do que para os americanos. Juraschek, Steffes e Selvin (2012b) dosaram a frutossamina por meio de kit comercial (Roche Diagnostics). Apesar de não formalmente descrito, trata-se do método NBT de segunda geração. Esses autores também encontraram correlação significativa entre idade e frutossamina.

Tabela 14 – Coeficientes de correlação linear entre frutossamina e outros marcadores de hiperglicemia na população americana^a e brasileira (estudo atual).

| | Americanos | Brasileiros |
|--------------------|------------|-------------|
| Frutossamina x A1c | | |
| População Geral | 0,40 | 0,22 |
| Diabéticos | 0,44 | 0,52 |
| Não diabéticos | 0,22 | 0,10 |
| Branco | 0,35 | 0,19 |
| Não Branco | 0,43 | 0,25 |
| Homens | 0,48 | 0,23 |
| Mulheres | 0,35 | 0,22 |
| Frutossamina x GJ | | |
| População Geral | 0,33 | 0,26 |
| Diabéticos | 0,33 | 0,60 |
| Não diabéticos | 0,16 | 0,11 |
| Branco | 0,31 | 0,21 |
| Não Branco | 0,31 | 0,30 |
| Homens | 0,30 | 0,21 |
| Mulheres | 0,35 | 0,21 |
| A1c x GJ | | |
| População Geral | 0,48 | 0,37 |
| Diabéticos | 0,44 | 0,33 |
| Não diabéticos | 0,22 | 0,16 |

^aJURASCHECK, STEFFES, SELVIN, 2012

A1c, Hemoglobina Glicada; GJ, Glicemia de Jejum.

Jurascheck, Steffes e Selvin (2012) testaram modelos de correlação não lineares entre as variáveis frutossamina e A1c, melhorando o coeficiente de determinação (R^2) de 0,39 para 0,46. No nosso estudo, o coeficiente de determinação estabelecido com a relação linear foi de 0,30. Contudo, ele se eleva para 0,41 utilizando-se uma função quadrática. O teste de Cusum, aponta desvio significativo da linearidade para a correlação entre essas variáveis ($p=0,03$). Avaliando os dados da população brasileira, a correlação entre frutossamina e GJ apresentou R^2 de 0,38, progredindo para 0,54 na função quadrática. Há também significativo desvio da linearidade na

avaliação da relação entre essas duas variáveis ($p < 0,01$, teste de Cusum). Modelos de regressão não linear foram também testados em uma população chinesa (SHI e LV, 2016). Foi realizada uma análise retrospectiva com inclusão de resultados de 549 indivíduos atendidos em um hospital universitário (*Anhui Medical University*). Essa população era constituída por 54,1% de homens e apresentava a idade mediana de 64 anos. Com o ajuste linear, a correlação entre a frutossamina e A1c foi de 0,745. Para um modelo não linear, o incremento foi pequeno ($r = 0,792$). A comparação entre os dois coeficientes não foi estatisticamente significativa ($p = 0,057$), apesar de mostrar clara tendência.

As concentrações de frutossamina, correspondente aos percentis dos testes de GJ, A1c e 2-h PD cuja concentração correspondia ao critérios diagnóstico para DM foram próximas entre si, com valores entre 251 a 259 $\mu\text{mol/L}$. O valor de 257 μmol foi utilizado nesse estudo para comparar o desempenho da frutossamina contra a A1c no diagnóstico do diabetes quando definido pela GJ e 2-h PD. Jurascheck, Steffes e Selvin (2012b) conduziram análises similares para avaliar o desempenho da frutossamina excluindo indivíduos tomando medicamentos para diabetes ou com história autorreferida de DM. A tabela 15 mostra o desempenho da frutossamina de acordo com o critério diagnóstico adotado.

Tabela 15 – Desempenho diagnóstico da frutossamina de acordo com o critério diagnóstico mensurado a partir da área sob a curva (AUC-ROC) nos trabalhos de Jurascheck, Steffes e Selvin (2012b) e o presente trabalho

| | Jurascheck, Steffes e Selvin (2012b) | Presente estudo |
|---------------------|---|------------------|
| GJ \geq 126 mg/dL | 0,77 (0,71-0,83) | 0,74 (0,72-0,76) |
| A1c \geq 6,5 | 0,69 (0,67-0,77) | 0,70 (0,68-0,72) |

GJ, Glicemia de Jejum, A1c; Hemoglobina glicada.

A exclusão dos indivíduos diabéticos no estudo americano ocorreu em dois grupos (excluindo aqueles sem medicamentos para diabéticos em um momento e aqueles com DM autorreferido em outro momento). No estudo brasileiro esses critérios foram adotados simultaneamente. Na tabela, para os dados americanos, estão representados os indivíduos após exclusão do diagnóstico de DM autorreferido. Os resultados para o grupo tendo excluído uso de medicamentos para DM são muito semelhantes.

Em novo estudo incluindo participantes do estudo ARIC ($n = 12306$), dessa vez utilizando resultados de exames obtidos em uma segunda visita dos participantes (entre 1990 a 1992),

foram encontrados coeficientes de correlação ainda mais elevados entre frutossamina e GJ ($r=0,81$) e entre frutossamina e A1c ($r=0,82$) na população total, incluindo diabéticos e não diabéticos. A média de idade dos participantes foi de 56,9 anos. O achado de níveis de frutossamina mais elevados em negros foram mantidos também nessa nova avaliação. Os testes de frutossamina foram executados em método comercial (Roche Modular P800) em amostras estocadas a -70°C . Comparado ao nosso estudo, níveis basais de GJ e A1c foram em média mais elevados (SELVIN, 2014).

Outra coorte serviu de base para avaliação da frutossamina frente os outros testes para diagnóstico do DM. Malmström et al. estudaram 10987 indivíduos da coorte AMORIS. Esse estudo avaliou indivíduos com idade entre 2 e 97 anos (média de 57 anos) recrutados durante 1985-1996 na cidade de Estocolmo, Suécia. Dos 10897 indivíduos, 5590 tiveram amostras de sangue colhidas após período de jejum. A frutossamina foi dosada pelo método NBT em um analisador automático (AutoChemist-PRISMA/PRISMA). Os coeficientes de correlação linear entre frutossamina e GJ ($r=0,80$) e frutossamina e A1c ($r=0,79$) foram similares quando obtidos para todo o grupo. No grupo de indivíduos com diagnóstico recente de diabetes a correlação entre frutossamina e A1c foi $r=0,75$. A mesma correlação foi encontrada para indivíduos com diagnóstico prévio de DM. Em indivíduos com pré-diabetes a correlação entre frutossamina e A1c foi bem mais baixa, $r=0,11$. A associação da frutossamina com A1c sofreu alterações discretas quando ajustadas por sexo, idade, albumina e IMC. A exclusão de indivíduos com diagnóstico prévio de anemia, insuficiência renal crônica também não alterou as associações da frutossamina com A1c e GJ. Utilizando critérios definidos pela ADA (com GJ ou A1c), a frutossamina apresentou $\text{AUC} = 0,91$ no grupo de indivíduos com amostras coletadas em jejum. A AUC da frutossamina (0,91) e da A1c (0,90) foram similares quando o diagnóstico de DM foi definido apenas pela GJ. Com um valor de corte de 2,5 mmol/L a frutossamina apresentou sensibilidade de 61% e especificidade de 98% quando o diagnóstico de DM foi baseado na GJ (MALMSTRÖM et al., 2014).

Outro estudo, a partir de uma coorte para estabelecer o status da saúde cardiometabólica, avaliou o desempenho da frutossamina para diagnosticar o DM em população de 217 imigrantes africanos residentes nos Estados Unidos. A idade média foi de 39 anos (intervalo total de 20 a 64 anos), sendo 69% do sexo masculino e com IMC médio de 27,6, variando de 18,2 a 41,2 kg/m^2 . Os pacientes realizaram jejum de 12h e coletaram os exames no período da manhã. O objetivo foi avaliar a capacidade de se diagnosticar indivíduos com a condição de pré-diabetes, definida como $\text{GJ} \geq 100 \text{ mg}/\text{dL}$ e $< 126 \text{ mg}/\text{dL}$ e/ou $2\text{-h PD} \geq 140 \text{ mg}/\text{dL}$ e $< 200 \text{ mg}/\text{dL}$. O

valor de corte da frutossamina foi definido como o valor correspondente ao último tercil para frutossamina baseado nessa mesma população (230 $\mu\text{mol/L}$). Procedimento similar foi realizado para A1c e o valor coincidiu com aquele utilizado pela ADA para pré-diabetes (5,7%). A sensibilidade da frutossamina para diagnóstico de pré-diabetes nessa população foi de 41% com especificidade de 66%. Níveis discretamente inferiores ao da A1c, respectivamente 50% e 75%, mas ambos sem diferença estatística. De forma similar a AUC-ROC da frutossamina foi 0,55 (IC95%: 0,47-0,63) e para A1c 0,63 (IC95%: 0,55-0,71) ($p=0,36$). Nesse estudo, a albumina glicada também foi avaliada e o desempenho foi semelhante ao da A1c e frutossamina. Dos 74 indivíduos diabéticos diagnosticados pelo TTOG, 24 foram diagnosticados apenas pela frutossamina ou albumina glicada (SUMMER et al., 2016).

Uma população de 2877 chineses foi submetida ao TTOG e a concentração da 2-h PD ≥ 200 mg/dL foi considerada o critério diagnóstico de DM. Frutossamina foi dosada pelo reagente comercial (Roche) em um analisador automático (Cobas-bio). O desempenho da GJ, A1c e frutossamina foi avaliado por meio da curva ROC. A sensibilidade e especificidade encontradas para GJ, A1c e frutossamina foram, respectivamente, 85,1% e 84,4%; 77,5% e 78,8% e 75,2% e 76,9%. A avaliação conjunta da GJ e frutossamina poderia reduzir a necessidade do TTOG em 85,5% nos indivíduos em investigação para DM, reservando esse teste apenas quando os critérios GJ ≥ 100 mg/dL e < 126 mg/dL além de frutossamina ≥ 235 $\mu\text{mol/L}$ fossem observados. Níveis de frutossamina também foram mais elevados em homens. As correlações da frutossamina com a GJ, a 2-h PD e A1c foram, respectivamente, 0,46; 0,46 e 0,33 (KO et al., 1998). No nosso trabalho, a frutossamina com concentração inferior a 197 $\mu\text{mol/L}$ foi capaz de prever o TTOG não diagnóstico em 8,4% dos indivíduos de raça/cor da pele branca. Para esse grupo tivemos 654 TTOG realizados, sendo 27 positivos e 627 negativos.

Apesar de significativas, as correlações encontradas para a população total no nosso estudo foram inferiores aos de outros autores acima citados (SHIMA et al., 1989) (SELVIN et al., 2014) (MALMSTRÖM et al., 2014), mas similar a outros (JURASCHEK et al., 2012b) (KOL et al., 1998) (Tabela 16). Avaliamos cerca de 2200 indivíduos. Esse número é similar com o de dois estudos (JURASCHEK et al., 2012b) (KOL et al., 1998), inferior a dois outros (SELVIN et al., 2014) (MALMSTRÖM et al., 2014) e superior a outro (SHIMA et al., 1989). A amplitude das concentrações das variáveis analisadas é considerada similar entre os estudos. É possível que parte da diferença seja secundária à escolha entre o coeficiente de correlação utilizado, Spearman ou Pearson. Usualmente a escolha de um, ou outro, leva em consideração a distribuição dos dados em determinada amostra. Em casos de evidência de não normalidade, a

escolha usual seria o coeficiente de Spearman. Há considerável preocupação com o incremento do erro Tipo I quando utilizamos o coeficiente de Pearson em distribuições com grandes desvios da normalidade. (BISHARA & HITTNER, 2012). Juraschek et al. (2012b) utilizaram coeficiente de correlação de Spearman e apresentaram resultados mais próximos ao do nosso estudo. Os demais utilizaram o coeficiente de correlação de Pearson (MALMSTRÖM et al., 2014) ou não especificaram (SHIMA et al., 1989) (SELVIN et al., 2014) (KOL et al., 1998). A utilização do coeficiente de Pearson elevaria de forma muito significativa todas as correlações encontradas com as nossas variáveis e que foram originalmente determinadas pelo método de Spearman: entre frutossamina e GJ (de 0,26 para 0,62); frutossamina e A1c (de 0,22 para 0,55); frutossamina e 2-h PG (de 0,10 para 0,27).

Tabela 16 – Correlações de toda a população geral de cada um dos estudos entre frutossamina com os testes A1c e GJ

| | A1c | GJ |
|-------------------------|------|------|
| Juraschek et al., 2012b | 0,40 | 0,33 |
| Selvin et al., 2014 | 0,82 | 0,81 |
| Malmström et al., 2014 | 0,79 | 0,80 |
| Kog et al., 1998 | 0,33 | 0,46 |
| Pedrosa et al., 2018 | 0,22 | 0,26 |

GJ, Glicemia de Jejum, A1c; Hemoglobina glicada.

Devemos também considerar diferenças na correlação entre a frutossamina e outros marcadores glicêmicos como fruto do comportamento distinto de glicação entre populações diferentes. Nossa análise revelou concentrações elevadas de frutossamina na população autorreferida como não branca. Essa diferença permaneceu mesmo quando analisamos somente a população não diabética e, posteriormente, a população sem nenhum critério de anormalidade nos marcadores glicêmicos. Negros americanos apresentaram concentrações mais elevadas de frutossamina e A1c (JURASCHEK et al., 2012b) (SELVIN et al., 2011b).

Podemos supor a existência de possíveis diferenças no comportamento da associação da frutossamina com outros marcadores glicêmicos entre populações diferentes, justificando correlações e desempenhos diagnósticos distintos entre essas variáveis em diferentes populações. Em população de imigrantes africanos nos Estados Unidos, Summer et al. (2016) avaliaram o desempenho da frutossamina no diagnóstico do pré-diabetes comparando com o desempenho da A1c. Observou-se que os imigrantes cujo pré-diabetes foi detectado somente

pela frutossamina e/ou AG, e não A1c, eram mais jovens, tinham menor IMC, menor circunferência abdominal e menor gordura visceral. Na população ELSA-Brasil, utilizando o valor de corte estabelecido nesse trabalho (257 $\mu\text{mol/L}$), comparamos o grupo de indivíduos diagnosticados somente pela frutossamina e não pela GJ ou A1c. Esses indivíduos tinham IMC mais baixo e eram mais jovens. Esses dados apontam para um possível papel complementar da frutossamina em indivíduos com pré-diabetes em rastreio para diabetes e com características clínicas específicas.

Um intervalo de referência da frutossamina para a população brasileira foi gerado a partir da população selecionada nesse estudo. Os intervalos de referência constituem a primeira avaliação médica do resultado do exame laboratorial, notadamente na ausência de resultados associados a decisões médicas baseados em evidências. Os indivíduos selecionados para a geração do intervalo de referência devem ser representativos da população a qual pertencem. Para chegar a esse grupo, faz-se necessária a aplicação de critérios de inclusão e exclusão e a seguir a escolha do método para estratificação dos dados em diferentes subpopulações (CERIOTTI, HINZMANN, PEGHINI, 2009). O protocolo do CLSI (CLSI, 2008) foi utilizado na geração do intervalo de referência do presente trabalho. Utilizamos a população de um dos centros participantes do estudo ELSA-Brasil. Após a exclusão de indivíduos com alterações em testes glicêmicos e A1c, bem como microalbuminúria e creatinina, contamos com uma amostra final de 466 indivíduos. No entanto, cabe ressaltar que o maior impacto na formação dessa amostra deu-se após a exclusão de indivíduos com alterações em marcadores de hiperglicemia.

A construção do intervalo de referência sugerido pelo CLSI após a obtenção dos resultados a partir de uma população referência é feita por meio da utilização dos percentis 2,5 e 97,5, estabelecidos de forma não paramétrica e com número amostral não inferior a 120 (CLSI, 2008). A escolha pelo intervalo central de 95% é de certa forma arbitrária e estabelecida ainda nos anos 80 do século passado (CERIOTTI, HINZMANN, PEGHINI, 2009). Essa exigência mantém a possibilidade da construção de intervalos de confiança de 90% para os limites superiores e inferiores do intervalo de referência estabelecido. Número amostral inferior a 120 e superior ou igual a 80 ainda podem ser utilizados, desde que a construção desse intervalo seja também modificada, sendo estabelecida pelo chamado método robusto (CLSI, 2008) (HORN, PESCE, COPELAND, 1998).

A estratificação dos dados, é realizada por meio do método de Harris-Boyd (CLSI, 2008). A estratificação é importante quando se observa comportamento distinto das variáveis de acordo

com características fisiológicas dos indivíduos, tais como idade, sexo, raça, IMC, etc. A definição dessa estratificação usualmente é dada por meio de ferramentas criadas especificamente para essa finalidade. A simples utilização de testes estatísticos comuns poderiam levantar a necessidade de estratificação dos intervalos de referência em populações muito grandes, onde seriam observadas diferenças estatisticamente significativas, mas clinicamente irrelevantes (HARRIS & BOYD, 1990).

A questão principal para a estratificação de um intervalo de referência seria o percentual de valores alterados dos tradicionais 2,5% acima ou 2,5% abaixo que seriam permitidos para uma subpopulação. Harris & Boyd (1990) propuseram que esse intervalo fosse não maior que 4% e não inferior a 1%. Na construção desse cálculo, leva-se em consideração não apenas a média, mas também os desvios-padrão dos subgrupos. Apesar da grande popularidade alcançada por essa abordagem, uma limitação clara seria sua restrição para utilização em dados com distribuição normal (ou gaussiana). Para lidar com essa dificuldade, outras formas de estratificação do intervalo de referência aplicáveis às populações com distribuição não normal (e também normal) foram desenvolvidas. (LAHTI et al.; 2002). Avaliação de estratificação de dados tão somente pela inspeção visual dos dados, por gráficos de histograma e *Forest Plot*, já foi descrita e utilizada recentemente (SELVIN, et al., 2018).

Outras formas de construção de intervalos de referência, não necessariamente baseados nos princípios de Harris e Boyd têm sido discutidas e executadas. As propostas variam principalmente nos critérios de seleção dos indivíduos, na estratificação dos dados e número amostral (PAVLOV, WILSON, DELGADO, 2012) (DALY et al.; 2017) (OZARDA, et al.; 2013).

A escolha das variáveis para avaliação da estratificação no presente trabalho foi feita após verificação de quais variáveis estariam relacionadas ao valor da frutossamina nessa população. Essa verificação foi realizada por meio da regressão linear simples e múltipla. Com exceção da idade, as outras variáveis avaliadas se mantiveram significativas no modelo e foram submetidas aos critérios de estratificação de Harris & Boyd. Apenas a variável sexo mostrou-se significativa para a estratificação após análise multivariada. Concentrações mais elevadas de frutossamina foram observadas em homens quando comparadas às mulheres. Apesar de não haver necessidade de estratificação para as variáveis IMC e cor da pele/raça autorreferida, elas apresentaram diferença estatística quanto às concentrações de frutossamina. Concentrações mais baixas de frutossamina foram observadas em indivíduos com IMC mais elevado e concentrações

mais elevadas de frutamina em indivíduos com cor da pele/raça autorreferida como não branca.

De uma forma geral, as variáveis sexo, idade, cor da pele/raça e IMC são citadas como capazes de influenciar os níveis de frutamina em diferentes populações. Summer et al. (2015), avaliando imigrantes africanos residentes nos Estados Unidos, descreveram uma correlação negativa entre IMC e frutamina ($r=-0,23$, $p=0,001$). Nesse estudo, apenas indivíduos com pré-diabetes e normoglicêmicos (não diabéticos) foram incluídos.

Em participantes americanos do *Atherosclerosis Risk in Communities* (ARIC) os marcadores A1c, frutamina, e inclusive GA, foram mais elevados na população negra, mesmo quando estratificados de acordo com a glicemia de jejum. A glicemia de jejum não apresentou diferença entre a população negra e branca. Apesar dessa diferença, resultados dessa coorte indicam desempenho idêntico para negros e brancos em termos de predição de eventos vasculares, mortalidade e doença microvascular para a frutamina e GA (SELVIN, et al. 2014).

Em um subestudo (CARMRI) da coorte ARIC, Jurashek et. al. (2012b) obtiveram resultados de frutamina mais elevados em homens e em negros. Observaram também, diferentemente do nosso estudo, correlação entre idade e frutamina, apesar do intervalo total da idade naquele trabalho ser de 60 a 84 anos.

Os dois estudos citados logo acima não tinham por objetivo a determinação de intervalos de referência. As variáveis IMC, idade, sexo e raça foram avaliadas em outros trabalhos com a perspectiva de construção de intervalo de referência para frutamina. As características gerais desses trabalhos e os intervalos confeccionados estão disponíveis na tabela 17.

Os trabalhos selecionados na tabela 17 representam estudos que utilizaram a segunda versão do método NBT para dosagem de frutamina, ainda que de fabricantes e analisadores diferentes.

Baker et al. (1991), avaliaram uma população da Nova Zelândia com idade mediana de 47 anos e intervalo total de 33 a 78 anos. A partir de um grupo de 2321 indivíduos, foram excluídos os com diagnóstico de DM e alteração da tolerância à glicose pelo TTOG. Apesar de mencionar ausência de diferença nas concentrações de frutamina quando estratificada por sexo e idade, não há especificação da ferramenta utilizada para essa conclusão. O intervalo corrigido pela concentração de proteína foi realizado, mas os autores concluem que não há vantagem nessa correção, apesar da confecção do intervalo e da própria avaliação da sua adequação não parecerem claras no artigo.

Tabela 17– Intervalos de referência de frutosamina utilizando o método NBT segunda geração

| | Amostra | Intervalo ($\mu\text{mol/L}$) | Kit e Analisador | Comentário |
|---|---|--|---|---|
| Baker et al 1991 – Nova Zelândia | 2211 não diabéticos (2-h PD < 140 mg/dL; idade 33 a 78 anos (mediana 47 anos) | 202-296 | F. Hoffmann-La Roche/ Cobas- Fara | Sem efeito de sexo e idade para estratificação. |
| Cefalu et al 1991 – Estados Unidos | 230 não diabéticos; A1c \leq 7,0% (idade 18 a 70 anos) | \leq 289 | Roche Reagents/Cobas- Mira | Não avaliou estratificação |
| Lin et al 1996 – Estados Unidos | 228 não diabéticos GJ < 90 mg/dL | 202-282 | Boehringer Mannheim/ Hitachi 747-200 | Não avaliou fatores para estratificação. |
| Chen et al 2016 – China | 1497 saudáveis (GJ < 110 mg/dL; 2-h PD < 140 mg/dL; IMC normal; etc); idade 20 a 85 anos; 73,3% mulheres | 20 a 65 anos 215-287 65 ou mais 226-325 | Roche/Cobas 8000 | Avaliou sexo e idade. Sexo não apresentou diferença. |
| Zhou et al 2016 – China | 458 indivíduos; (GJ 70-110 mg/dL; creatinina normal; etc). Idade 20 a 79 anos (mediana 43 anos); 50,7% mulheres | 220-298 | Roche/Roche Modular DPP | Avaliou sexo e idade. Sem necessidade de estratificação. |
| Selvin et al 2018 – Estados Unidos | 1799 indivíduos não diabéticos, 51,4% de mulheres 47 a 68 anos, | 195-258 | Roche/Roche Modular P800 | Avaliou sexo, idade, IMC e raça |
| Pedrosa et al 2018 – Brasil | 466 indivíduos (GJ, A1c, 2-h PD normais), mulheres 68,9%, idade 35 a 73 anos, mediana 48 anos. | Mulher 186-248 Homem 196-269 | BioSystems S.A/AU 580 Beckman Coulter | Estratificação para sexo, mas não para idade, cor da pele autorreferida e IMC. |

NBT- nitroblue tetrazolium

Um estudo americano recrutou 230 indivíduos não diabéticos a partir de valores de A1c iguais ou inferiores a 7%. Cabe lembrar que nessa ocasião os ensaios de A1c não eram padronizados. Utilizou o percentil 95 para definir apenas o limite superior do intervalo de referência. Não observou correlação dos níveis de albumina ou proteína total com a frutosamina. Outras variáveis para possível estratificação não foram avaliadas (CEFALU, et. al., 1991).

Lin et al. (1996) avaliaram amostras de indivíduos não diabéticos cujas coletas eram originalmente para execução de outros testes não relacionados ao estudo (avaliação do desempenho de uma plataforma comercial para a dosagem da frutossamina). Amostras provenientes de 23 centros da região da Califórnia nos Estados Unidos foram utilizadas. O intervalo de referência foi estabelecido na população cujo resultado de GJ foi inferior a 90 mg/dL. Não há dados clínicos mencionados para a confecção do intervalo de referência. Intervalos de referência corrigidos para albumina e proteína foram também confeccionados. Resultados de frutossamina corrigidos pela albumina e proteína apresentaram melhor correlação com outros marcadores (A1c e GJ).

Um estudo conduzido na China estabeleceu intervalo de referência de frutossamina para aquela população. Esse estudo utilizou critérios baseados na GJ e 2-h PD para selecionar a população. O protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008) foi utilizado na construção dos critérios de seleção para a população referência. Uma vasta lista de critérios de exclusão foi utilizada, além dos critérios já conhecidos de normalidade para a glicose. Foram excluídos indivíduos com hipoproteinemia, hipoalbuminemia, doenças cardiovasculares, doença renal, desordens endócrinas, obstrução hepática, consumo de álcool, uso de contraceptivo oral, exercício intenso ou trabalho manual pesado, grávidas e lactantes. Todos os indivíduos apresentavam IMC normal. A idade dos participantes foi estratificada em três grupos etários: 20 a 45 anos, 46 a 65 anos e > 65 anos. O grupo de indivíduos com idade superior a 65 anos apresentou níveis estatisticamente mais elevados de frutossamina. Não houve diferença dos níveis de frutossamina entre os sexos. Apesar de se inspirar no protocolo do CLSI, a estratificação dos grupos foi baseada em testes estatísticos comuns (análise de variância - ANOVA), (CHEN, et al., 2016).

Outro estudo, também chinês, estabeleceu intervalo de referência para frutossamina. Foram utilizados como critério de inclusão indivíduos com valor de GJ entre 70 a 110 mg/dL. Foram excluídos indivíduos com hipoalbuminemia, alteração de enzimas hepáticas, creatinina, ureia, ácido úrico, triglicérides, colesterol e positividade para o antígeno de superfície da hepatite B. Esse estudo utilizou o algoritmo de Lahti para julgamento da estratificação dos intervalos de referência. O intervalo foi estabelecido a partir dos percentis 2,5 e 97,5. A mediana da idade foi de 43 anos, com intervalo total de 20 a 79 anos. Os dados foram coletados a partir de registros médicos em uma instituição médica de ensino. Níveis de frutossamina foram discretos e significativamente mais elevados em homens do que em mulheres. No entanto, não houve

necessidade de estratificação dos intervalos de referência. Não encontrou, também, necessidade para estratificação por idade (ZHOU, SHI, LV, 2016).

Selvin, et al. (2018) definiram intervalos de referência a partir da população do estudo ARIC. Foram selecionados os indivíduos não diabéticos. Posteriormente, a exclusão de participantes ocorreu pela análise de *outliers* pelo critério de Tukey e, em sequência, indivíduos cuja coleta foi realizada sem jejum, níveis de albumina < 3 g/dL, aumento de enzimas hepáticas, tabagistas, disfunção tireoidiana clínica ou subclínica, redução da função renal, doença cardíaca, hipertensão e dislipidemia. Uma população saudável de referência com 1799 indivíduos foi relacionada. Utilizou-se os percentis 2,5 e 97,5 para geração do intervalo. A comparação entre subgrupos para estratificação foi feita por meio de histogramas e gráficos *forest plots*. Concentrações de frutamina foram mais elevadas em homens e em negros, e mais baixas em categorias mais baixas de IMC. Contudo, não houve necessidade de estratificação para essas variáveis segundo a interpretação clínica dos autores. O valor de frutamina correspondente ao valor da A1c de 6,5% (percentil 96,5) foi de 270,2 $\mu\text{mol/L}$. Valores de frutamina corrigidas pela albumina sérica melhoraram a correlação com níveis de A1c.

O intervalo de referência encontrado no presente estudo possui limite superior equivalente ao encontrado no trabalho de Selvin et al. (2018). No entanto, diverge dos demais autores. O valor de referência atualmente sugerido pelo fabricante do ensaio é de 205 a 285 $\mu\text{mol/L}$, publicado em 1989 a partir de uma população europeia (ZHOU, SHI, LV, 2017). Vários fatores podem ter contribuído para a divergência com alguns intervalos de referências propostos por outros autores. Os critérios de inclusão foram muito distintos entre os diversos estudos. Diferentes valores de corte de GJ foram selecionados, bem como a utilização ou não, de outros marcadores para definição de hiperglicemia (A1c e 2-h PD). Nesse estudo, utilizamos três testes para exclusão da alteração do metabolismo glicêmico, e somente na vigência da completa normalidade em todos eles simultaneamente, o participante foi incluído. Em parte, isso pode explicar os níveis mais baixos de frutamina encontrados, porque outros autores utilizaram apenas GJ (LIN et al. 1996) (ZHOU, SHI, LIV, 2017), GJ e 2-h PD (BAKER et al., 1991) (CHEN et al., 2016) e A1c (CEFALU et al., 1991), e ainda com valores de corte diferentes. Outras variáveis clínicas e laboratoriais foram utilizadas como critério de exclusão, como doenças hepáticas e renais, hipoalbuminemia, doenças cardiovasculares, consumo de álcool, alterações ultrassonográficas de fígado, vesícula biliar e pâncreas, alterações de enzimas hepáticas, perfil lipídico, antígeno de superfície para Hepatite B (HBsAg) entre outros (CHEN et al., 2016) (ZHOU et al., 2017) (SELVIN et al., 2018). Selvin E et al (2018) excluam

indivíduos diabéticos, bem como outras variáveis clínicas e laboratoriais (enzimas hepáticas elevadas, disfunção tireoidiana, tabagismo, hipertensão arterial entre outras). Contudo, os autores relataram que a maior influência foi a exclusão de indivíduos diabéticos com pouca ou nenhuma influência das outras variáveis que constituíam critérios de exclusão. Para a geração do intervalo de referência na população ELSA-Brasil, além dos marcadores glicêmicos alterados, foram excluídos indivíduos com concentrações anormais de creatinina e microalbuminúria.

Outro fator para a discordância entre os intervalos de referência que não pode ser ignorado é a utilização de kits diferentes. O presente estudo utilizou o kit da BioSystems no analisador automático AU 580 (Beckman Coulter). Nenhum outro estudo relacionado utilizou esse mesmo fabricante ou equipamento. Todos utilizaram o kit da Roche Diagnóstica em diferentes analisadores do mesmo fabricante. Não foi encontrado trabalho que comparasse diferentes fabricantes para o mesmo método de dosagem de frutossamina cujo princípio fosse o NBT de segunda geração.

Por fim, mas não menos importante, seria o método estatístico utilizado para a geração do intervalo de referência. Sistematização da construção do intervalo de referência não foi observada em todos os trabalhos. Contudo, todos apresentaram o intervalo de referência por meio dos percentis 2,5 e 97,5. A exceção foi o estudo de Cefalu et. al. (1991) que utilizaram apenas o percentil 95. A estratificação não chegou a ser avaliada por alguns autores (CEFALU et al., 1991) (LIN et al. 1996). No nosso estudo a única estratificação necessária foi para o sexo, dentro das variáveis investigadas. Três outros estudos também avaliaram a estratificação, mas não encontraram a necessidade para intervalos de referência distintos (BAKER et al., 1991) (ZHOU, SHI, LIV, 2017) (SELVIN et. al., 2018). A idade foi um fator para estratificação em um dos artigos (CHEN et al., 2016). Diferentes ferramentas para avaliação da estratificação foram utilizadas, não permitindo uniformidade também nesse critério. Utilizamos a estratificação segundo Harris-Boyd de acordo com o documento do CLSI (12).

A concentração de frutossamina foi avaliada em 25 indivíduos não obesos e em 25 indivíduos obesos. Todos os indivíduos foram avaliados com o TTOG e o resultado considerado normal. A concentração de frutossamina foi significativamente mais baixa nos indivíduos obesos quando comparada a dos indivíduos não obesos. A frutossamina correlacionou-se de forma inversa com o IMC ($r=-0,72$; $p<0,01$). De forma especulativa os autores sugeriram a possível presença de um inibidor da glicação da frutossamina nos indivíduos obesos (SKRHA & SVACINA, 1991).

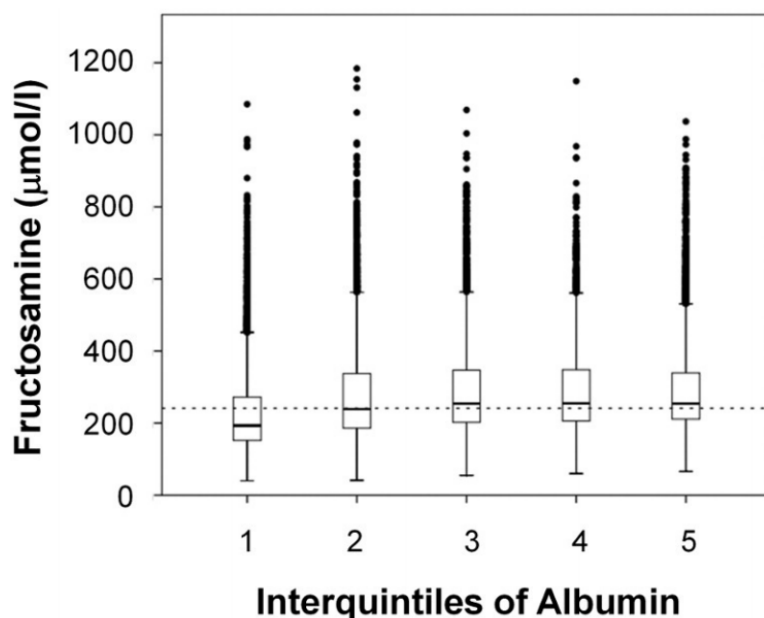
Broussolle et al., (1991) estudaram indivíduos obesos e não obesos, estratificados segundo o diagnóstico de diabetes. Indivíduos obesos não diabéticos apresentaram níveis mais baixos de frutossamina do que indivíduos não obesos e não diabéticos. Mesmo corrigindo-se o resultado de frutossamina pelo valor da proteína sérica, a diferença entre os dois grupos foi mantida. Concentrações de albumina e pré-albumina estavam normais em todos os participantes do estudo. O mesmo perfil de resultados da frutossamina foi encontrado em indivíduos diabéticos. Estudos *in vitro* demonstraram que a formação de frutossamina foi significativamente mais baixa no soro de indivíduos obesos.

Koga et. al. (2007) estudaram indivíduos obesos e não obesos não diabéticos. Os autores analisaram a relação do IMC com o marcador relacionado à inflamação crônica, a proteína C reativa de alta sensibilidade (hs-PCR, do inglês *high sensitivity C-reactive protein*) com os níveis da albumina glicada. Indivíduos diabéticos não foram avaliados devido a outras variáveis presentes nesses indivíduos (maior diassociação da AG e A1c, coexistência de doença aterosclerótica alterando níveis de hs-CRP). Observou-se que os níveis de hs-PCR estavam positivamente associados com IMC ($r=0,458$), mas negativamente associados à AG ($r=-0,300$). Observou-se, ainda, correlação fracamente positiva entre hs-PCR e A1c ($r=0,153$). As concentrações de albumina não estiveram associadas nem com AG, IMC ou hs-PCR. Aventou-se a hipótese de que a inflamação reduziria a síntese de albumina, bem como aumentaria sua taxa catabólica.

A influência da correção do resultado da frutossamina pela albumina ou proteína foi recentemente avaliado. O estudo utilizou mais de 20114 registros de um laboratório universitário espanhol de pacientes diabéticos e não diabéticos. A frutossamina, neste estudo, foi dosada utilizando-se o ensaio enzimático GlyPro (Genzyme, Kent, Reino Unido) em um analisador Cobas Mira (Roche). As fórmulas para correção pela albumina e proteína foram respectivamente $42 \times \text{Frutossamina/albumina}$ e $70 \times \text{Frutossamina/proteína total}$. A concentração média de albumina e proteína total nesse grupo de indivíduos foi respectivamente 42 g/L e 70 g/L. Concentrações não corrigidas de frutossamina sofreram influência da albumina somente quando essa encontrava-se em níveis abaixo do normal (Figura 6). Frutossamina exibiu correlação com a albumina ($r=0,193$), mais acentuada em não diabéticos que diabéticos. De outra forma, a correlação da frutossamina com outros marcadores de diabetes (GJ e A1c) foi maior no grupo de diabéticos. A correlação entre o resultado de frutossamina corrigida e o resultado de A1c foi discretamente melhor do que o valor não corrigido. O desempenho diagnóstico da frutossamina foi avaliado pela curva ROC quando o diagnóstico foi estabelecido

pela GJ ou A1c. Para ambas as situações a frutossamina corrigida pela albumina foi superior à frutossamina corrigida pela proteína, que foi superior à frutossamina não corrigida. Para o diagnóstico pela GJ a AUC foi, respectivamente, 0,905; 0,895 e 0,878. Já para A1c, esses valores foram 0,834; 0,826 e 0,816. Apesar das diferenças estatisticamente significativas, a importância clínica foi considerada discreta e possivelmente sem impacto.

Figura 6 – Boxplots dos níveis de frutossamina em grupos de cinco concentrações de albumina (1, 13-38 g/L, n=7973; 2, 39-41 g/L, n=8751; 3, 42-43 g/L, n=8196; 4, 44 g/L, n=6384; 5, 45-55 g/L, n=9634). Linhas pontilhadas refletem a mediana da concentração da frutossamina em todos os pacientes (241 $\mu\text{mol/L}$).



Fonte: RODRÍGUEZ-SEGADE, S.; RODRÍGUES, J.; CAMIÑA, F. Corrected fructosamine improves both correlation with HbA1c and diagnostic performance. Clin Biochem, v.50, p.110-115, 2017.

De Shepper et al. (1988) observaram que a correção do resultado de frutossamina pela concentração da proteína total ou albumina em crianças diminuía a discrepância da concentração de frutossamina entre as crianças mais jovens (abaixo de 15 anos), reduzindo, mas não abolindo, a tendência a valores mais elevados de frutossamina em estratos etários mais elevados.

Alguns estudos já têm associado concentrações de frutossamina a desfechos clínicos. Selvin et al. (2014) relacionaram concentrações de frutossamina superiores a 264 $\mu\text{mol/L}$ ao aparecimento

de retinopatia diabética e doença renal crônica na coorte ARIC. Concentrações ainda mais baixas, entre 241 e 264 μmol foram associadas ao diagnóstico de diabetes autorreferido ou uso de medicamentos hipoglicemiantes. As associações entre frutossamina com desfechos clínicos (retinopatia e doença renal crônica) em pacientes diabéticos foram similares às aquelas observadas para a hemoglobina glicada (PARRINELLO & SELVIN, 2014).

Em estudo transversal com 1600 indivíduos da coorte ARIC, com e sem diabetes, a frutossamina foi associada à presença de complicações crônicas microvasculares do diabetes (albuminúria e retinopatia) (SELVIN, et. al., 2011b). Em outro estudo da mesma coorte, com três anos de seguimento, a frutossamina apresentou risco relativo de 3,99 (IC95% 1,93-8,28) para o desenvolvimento de diabetes (JURASCHEK, et. al., 2012a). No entanto, uma coorte brasileira, com seguimento de até sete anos (mediana de 57 meses) não conseguiu associar o surgimento de complicações crônicas microvasculares do diabetes com a concentração de frutossamina. Neste estudo foi utilizado um ensaio de frutossamina calibrado com DMF (CARDOSO, SALLES, et al., 2008).

Vos, et al. (2012), estudaram um grupo de 25 pacientes diabéticos com doença renal crônica (estágios 4 e 5 – pré-diálise ou em diálise). Esses pacientes tiveram a glicemia mensurada por meio de um sistema de monitoramento durante 48h (CGM – Guardian REAL-time Glucose Monitoring System, Medtronic, CA, EUA). Ao fim desse período, amostras de sangue foram coletadas. Grupo controle de indivíduos diabéticos sem doença renal foi também avaliado. A A1c não apresentou correlação com a glicemia média dos indivíduos com doença renal, diferentemente do observado no grupo controle. A frutossamina apresentou correlação com os níveis médios de glicose em ambos os grupos. Os níveis de albumina no grupo nefropata era de $40,6 \pm 4,9$ g/L. Contudo, Chen, et al. (2010), estudando indivíduos diabéticos com função renal normal e outros com estágios 3 e 4 da doença renal por doze semanas, observou melhor correlação da A1c com o automonitoramento (glicemia capilar) quando comparado à frutossamina. Ambos os marcadores, subestimaram a glicemia média. A correção da concentração da frutossamina pela albumina não melhorou a correlação nos indivíduos renais crônicos.

A dosagem da frutossamina reflete os níveis glicêmicos mais recentes (duas a três semanas) quando comparada à A1c (dois a três meses) permitindo a percepção da flutuação dos níveis de glicose mais precocemente. O atual método para dosagem da frutossamina utilizado nesse estudo é rápido, tecnicamente de fácil execução e de baixo custo, podendo ser implantado em áreas

com poucos recursos. No entanto, ainda apresenta limitações, sendo pouco padronizado e tendo a possibilidade de apresentar resultados menos confiáveis em estados hipoalbuminêmicos (doenças renais, hepáticas, disfunções tireoidianas). A sugestão de que o ensaio carecia de maior especificidade (SCHLEICHER, et al., 1988) foi feita quando o ensaio ainda não havia sido padronizado à semelhança de como é utilizado atualmente (SCHLEICHER & VOGT, 1990). Ainda assim, a possibilidade de que moléculas com atividade redutora presentes em altas concentrações (bilirrubina e vitaminas) possam interferir no ensaio, permanece (DANESE, et al., 2015).

As limitações do estudo estão relacionadas à ausência de análises em pacientes com doença renal estabelecida, haja vista a possibilidade de alteração dos níveis de frutamina nesse grupo. Apenas uma única dosagem de cada um dos marcadores clássicos para o diagnóstico do diabetes mellitus estava disponível, limitando o diagnóstico do diabetes a um único momento, diferentemente do preconizado atualmente, quando duas amostras coletadas em tempos distintos devem ser analisadas (ADA, 2018). Não houve representatividade de estratos etários mais jovens na nossa população, o que de alguma forma implica na menor generalização dos resultados de correlações da frutamina com outros testes para hiperglicemia, aplicabilidade do intervalo de referência e desempenho diagnóstico. Não se pode descartar a variabilidade entre ensaios. Diferentes fabricantes, versões diferentes do mesmo método e analisadores foram utilizadas para a dosagem da frutamina. Até que ponto essas diferenças contribuíram para eventuais discordâncias entre os estudos é impossível dimensionar nesse momento.

Com relação ao intervalo de referência mais especificamente, a amostra de conveniência não permite a generalização dos presentes achados para a população geral. O recrutamento dos indivíduos foi realizado *a posteriori*, a partir do banco de dados já gerado. Níveis séricos de albumina da população estudada não estavam disponíveis. Sabe-se que baixos níveis de albumina podem influenciar a concentração de frutamina, entretanto, sua influência é pequena em indivíduos normais, com mudanças marginais na interpretação do teste. Além do mais, incluímos somente indivíduos com resultados normais de creatinina e microalbuminúria, o que torna a possibilidade de inclusão de indivíduos hipoalbuminêmicos no estudo pouco provável.

Pontos fortes a serem ressaltados nesse trabalho incluem o fato do estudo refletir uma parcela representativa da população brasileira, principalmente em relação à sua variabilidade étnica, sendo o maior estudo comparando os três marcadores estabelecidos para diabetes com a

frutosamina nessa população. Todos os testes laboratoriais foram executados em um único centro (Universidade de São Paulo – USP), após rigorosa padronização da coleta do material biológico e transporte das amostras. A dosagem da frutosamina foi executada em amostras adequadamente acondicionadas. A avaliação da associação da frutosamina com 2-h PG foi poucas vezes avaliada em trabalhos anteriores.

Acredita-se que este seja o primeiro estudo realizado na população brasileira visando estabelecer intervalo de referência para a dosagem de frutosamina. A mensuração desse intervalo de referência na linha de base do ELSA-Brasil aqui relatada pode contribuir para futuros esforços visando definir valores de corte para rastreamento e diagnóstico do DM, especialmente em situações onde existam limitações ao uso da A1c e TOTG.

6 - Conclusão

Em conclusão, a frutossamina apresentou associação com GJ, 2-h PD e A1c em um grupo de indivíduos incluindo aqueles com diagnóstico de diabetes. Sua utilização pode, eventualmente, ampliar o número de testes para o diagnóstico de diabetes, especialmente em situações de pouca acessibilidade à dosagem da A1c ou em situações com alguma limitação clínica para a interpretação da A1c. Estudos adicionais capazes de sugerir valores de corte apropriados para essa finalidade (rastreamento e acompanhamento) devem ser considerados.

7 - Referências Bibliográficas

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes – 2018. In Standards of medical care in diabetes – 2018. Diabetes Care, v.41, suplemento 1, p.S13-S27, 2018.

AMBRUSTER, D. A. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. Clin Chem, v.33, p.2153-2163, 1987.

AQUINO, E. M. L.; BARRETO, S. M.; BENSENOR, I. M.; CARVALHO, M. S.; CHOR, D.; DUNCAN, B. B.; LOTUFO, P. A.; MILL, J. G.; MOLINA, M. D. C.; MOTA, E. L. A.; PASSOS, V. M. A.; SCHMIDT, M. I.; SZKLO, M. Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil): objectives and design. Am J Epidemiol, v.175, p.315-324, 2012.

BAKER, J.; METCALF, P.; SCRAGG, R.; JOHNSON, R. Fructosamine test-plus, a modified fructosamine assay evaluated. Clin Chem, v.37, p.552-556, 1991.

BONORA, E.; TUOMILEHTO, J. The pros and cons of diagnosing diabetes with A1c. Diabetes Care, v.34, suplemento2, p.S184-S190, 2011.

BIOSYSTEMS. Fructosamina NBT. BioSystems S.A. Costa Brava, 30, Barcelona (Spain). 04/2011.

BISHARA, A. J.; HITTNER, J. Testing the significance of a correlation with nonnormal data: comparison of Pearson, Spearman, transformation, and resampling approaches. Psychol Methods, v.17, p.399-417, 2012.

BROUSSOLLE, C.; TRICOT, F.; GARCIA, I.; ORGIAZZI, J.; REVOL, A. Evaluation of the fructosamine test in obesity: consequences for the assessment of past glycemic control in diabetes. Clin Biochem, v.24, p.203-209, 1991.

CAVAGNOLLI, G.; PIMENTEL, A. L.; FREITAS, P. A. C.; GROSS, J. L.; CAMARGO, J. L. Factors affecting A1C in non-diabetic individuals: review and meta-analysis. Clin Chim Acta, v.445, p.107-114, 2015.

CARDOSO, C. R. L.; SALLES, G. F. Predictors of development and progression of microvascular complications in a cohort of Brazilian type 2 diabetic patients. *J Diabetes Complications*, v.22, p.167-170, 2008.

CERIOTTI, F.; HINZMANN, R.; PANTEGHINI, M. Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem*, v.46, p.8-17, 2009.

CEFALU, W. T.; BELL-FARROW, A. D.; PETTY, M.; IZLAR, C.; SMITH, J. A. Clinical validation of a second-generation fructosamine assay. *Clin Chem*, v.37, p.1252-1256, 1991.

CHEN, H.; WU, T.; LIN, H.; JAP, T.; HSIAO, L.; LEE, S.; LIN, S. Hemoglobin A1c and fructosamine for assessing glycemic control in diabetic patients with CKD stages 3 and 4. *Am J Kidney Dis*, v.55, p.867-874, 2010.

CHEN, X.; WU, J.; LI, R.; WANG, Q.; TANG, W.; SHANG, X. The establishment of adult reference intervals on fructosamine in Beijing. *J Clin Lab Anal*, v.30, p.1051-1055, 2016.

COWIE, C. C.; RUST, K. F. BYRD-HOLT, D. D.; GREGG, E. W. FORD, E. S.; GEISS, L. S.; BAINBRIDGE, K. E.; FRADKIN, J. E. Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1c criteria in the U.S population in 1988-2006. *Diabetes Care*, v.33, p.562-568, 2010.

CSLI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline – Third edition, CLSI document C28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

DALY, C.H.; HIGGINS, V.; ADELI, K.; GREY, V. L.; HAMID, J. S. Reference interval estimation: methodological comparison using extensive simulations and empirical data. *Clin Biochem*, v.50, p.1145-1158, 2017.

DANESE, E.; MONTAGNANA, M.; NOUVENNE, A.; LIPPI, G. Advantages and pitfalls of fructosamine and glycated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes. *J Diab Sci Technol*, v.9, p.169-176, 2015.

De SCHEPPER, J.; DERDE, M.; GOUBERT, P.; GOCUS, F. Reference value for fructosamine concentrations in children's sera: influence of protein concentration, age, and sex. *Clin Chem*, v.34, p.2444-2447, 1988.

FEDELI, L.G.; VIDIGAL, P. G.; LEITE, C. M.; CASTILHOS, C. D.; PIMENTEL, R. A.; MANIERO, V. C.; MILL, J. G.; LOTUFO, P. A.; PEREIRA, A. C.; BENSENOR, I. M. Logistics of collection and transportation of biological samples and the organization of the central laboratory in the ELSA-Brasil. *Rev Saúde Pública*, v.47, p.S1-S9, 2013.

FLÜCKIGER, R.; WOODTLI, T.; BERGER, W. Evaluation of the fructosamine test for the measurement of plasma protein glycation. *Diabetologia*, v.30, p.648-652, 1987.

HARRIS, E. K.; BOYD, J. C. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. *Clin Chem*, v. 36, p. 265-270, 1990.

HORN, P. S.; PESCE, A. J.; COPELAND, B. E. A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem*, v.44, p.747-751, 1998.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION: IDF Diabetes Atlas, 7th ed, 2017. Disponível em <<http://www.IDF.org/diabetesatlas>>. Acesso em: 02 de mar. 2018.

JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R. Fructosamine: a new approach to the estimation of serum glycosylprotein. An index of diabetic control. *Clin Chim Acta*, v.127, p.87-95, 1982.

JOHNSON, R. N.; METCALF, P. A.; BAKER, J. R. Relationship between albumin and fructosamine concentration in diabetic and non-diabetic sera. *Clin Chim Acta*, v.164, p.151-162, 1987.

JURASCHEK, S. P.; STEFFES, M. W.; MILLER, E. R.; SELVIN, E. Alternative markers of hyperglycemia and risk of diabetes. *Diabetes Care*, v.35, p.2265-2270, 2012a.

JURASCHEK, S.P.; STEFFES, M. W.; SELVIN, E. Associations of alternative markers of glycemia with hemoglobin A1c and fasting glucose. *Clin Chem*, v.58, p.1648-1655, 2012b.

KO, G. T. C.; CHAN, J. C. N.; YEUNG, Y. T. F.; CHOW, C. C.; TSANG, L. W. W.; LI, J. K. L.; SO, W.; WAI, H. P. S.; COCKRAM, C. S. Combined use of a fasting plasma glucose concentration and HbA1c or fructosamine predicts the likelihood of having diabetes in high-risk subjects. *Diabetes Care*, v.21, p.1221-1225, 1998.

KOGA, M. OTSUKI, M.; MATSUMOTO, S.; SAITO, H.; MUKAI, M.; KASAYAMA, S. Negative association of obesity and its related chronic inflammation with sérum glycated albumin but not glycated hemoglobina levels. *Clin Chim Acta*, v.378, p.48-52, 2007.

KOSKINEN, P.; IRJALA, K. Stability of sérum fructosamine during storage. *Clin Chem*, v.34, p.2545-2546, 1988.

LAHTI, A.; PETERSEN, P. H.; BOYD, J. C.; FRASER, CG.; JORGENSEN, N. Objective criteria for portioning Gaussian-distributed reference values into subgroups. *Clin Chem* v.46, p.338-352, 2002.

LAHTI, A.; PETERSEN, P. H.; BOYD, J. C.; RUSTAD, P.; LAAKE, P.; SOBERG, H. E. Partitioning of nongaussian-distributed biochemical reference data into subgroups. *Clin Chem*, v.50, p.891-900, 2004.

LIN, M.; HOKE, C.; ETTINGER, B.; COYNE, R. V. Technical performance evaluation of BM/Hitachi 747-200 serum fructosamine assay. *Clin Chem*, v.42, p.244-248, 1996.

MALMSTRÖM, H.; WALLDIU, G.; GRILL, V.; JUNGNER, I.; GUDBJÖRNSDOTTIR, S.; HAMMAR, N. Fructosamine is a useful indicator of hyperglycaemia and glucose control in clinical and epidemiological studies – cross-sectional and longitudinal experience from the AMORIS cohort. *Plos One*, v.9:e111463.

MONTAGNANA, M.; PALEARI, R.; DANESE, E.; SALVAGNO, G. L.; LIPPI, G.; GUIDI, G. C.; MOSCA, A. Evaluation of biological variation of glycated (GA) and fructosamine in health subjects. *Clin Chim Acta*, v.423, p.1-4.

O'BRIEN, J. E.; BROOKES, M. Determination of reference values for a novel ketoamine-specific fructosamine assay for assessment of diabetic glycemic control. *Diabetes Technol Ther*, v.1, p.447-455, 1999.

OZARDA, Y.; ICHIHARA, K.; BARTH, J. H.; KLEE, G. Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clin Chem Lab Med*, v.51, p.1027-104, 2013.

PARRINELO, C. M.; SELVIN, E. Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management. *Curr Diab Rep*, v.14, p. 548, 2014.

PAVLOV, I. Y.; WILSON, A. R.; DELGADO, W. J. C. Reference interval computation: which method (not) to choose? *Clin Chim Acta*, v.453, p.1107-1114, 2012.

ROCHE. Cobas®. Fructosamina. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim. Alemanha. 10-2001.

RODRÍGUEZ-SEGADE, S.; RODRÍGUES, J.; CAMIÑA, F. Corrected fructosamine improves both correlation with HbA1c and diagnostic performance. *Clin Biochem*, v.50, p.110-115, 2017.

SACKS, D. B. A1c versus glucose testing: a comparison. *Diabetes Care*, v.34, p.518-523, 2011.

SACKS, D. B. Hemoglobin A1c in Diabetes: Panacea or Pointless? *Diabetes*, v.62, p.41-43, 2013.

SBPC/ML - SOCIEDADE BRASILEIRA DE PATOLOGIA CLÍNICA/MEDICINA LABORATORIAL. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica para coleta de Sangue Venoso. 2005.

SCHMIDT, M. I.; DUNCAN, B. B.; MILL, J. G.; LOTUFO, P. A.; CHOR, D.; BARRETO, S. M.; AQUINO, E. M. L.; PASSOS, V. M. A.; MATOS, S. M. A.; MOLIMA, M. C. B.; CARVALHO, M. S.; BENSENOR, I. M. Cohort profile: Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). *Int J Epidemiol* v.44, p.68-75, 2015.

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

SCHLEICHER E. D.; MAYER R.; WAGNER E. M.; GERBITZ K. Is serum fructosamine assay specific for determination of glycated serum protein? *Clin Chem*, v.34, p.320-323, 1988.

SCHWAB KO, DOERFER J, HALLERMANN K, KREBS A, SCHORB E, KREBS K, WINKLER K. Marked smoking-associated increased cardiovascular risk in childhood type 1 diabetes. *Int J Adolesc Med Health*, v.20, p.285-292, 2008.

SELVIN, E.; FRANCIS, L. M. A.; BALLANTYNE, C. M.; HOOGEVEEN, R. C.; CORESH, J.; BRANCATI, F. L.; STEFFES, M. W. Nontraditional markers of glycemia. *Diabetes Care*, v.34, p.960-967, 2011. (a)

SELVIN, E.; STEFFES, M. W.; BALLANTYNE, C. M.; HOOGEVEEN, R. C.; CORESH, J.; BRANCATI, F. L. Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of community-based data. *Ann Intern Med*, v.1545, p.303-309, 2011. (b)

SELVIN, E.; RAWLINGS, A.M.; GRAMS, M.; KLEIN, R.; SHARRET, A. R.; CORESH, J. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complication: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, v.2, p.279-288, 2014.

SELVIN, E.; WARREN, B.; XINTONG, H.; SACKS, D. B.; SAENGER, A. K. Establishment of community-based reference intervals for fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. *Clin Chem*, v.64, p.843-850, 2018.

SHI, D.; LV, L. Associations of glycemic markers: dose the non-linear fitting is better? *Clin Chim Acta*, v.458, p.103-105, 2016.

SHIMA, K.; ABE, F.; CHIKAKIYO, H.; ITO, N. The relative value of glycated albumin, hemoglobin A1c and fructosamine when screening for diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, v.7, p.243-250, 1989.

SKRHA, J.; SVACINA, S. Serum fructosamine and obesity. *Clin Chem*, v.37, p.2020-2021, 1991.

SUMMER, A. E.; DUONG, M. T.; ALDANA, P. C.; RICKS, M.; TULLOCH-REID, M. K. LAZIER, J. N.; CHUNG, S. T. SACKS, D. B. A1c combined with glycated albumin improves detection of prediabetes in africans: the Africans in America Study. *Diabetes Care*, v.39, p.271-277, 2016.

TAHARA, Y.; SHIMA, K. Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level. *Diabetes Care*, v.18, p.440-447, 1995.

VIGITEL BRASIL 2016. Ministério da Saúde, Distrito Federal 2017. Disponível em <http://www.portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf> Acesso em: 02 de mar. 2018.

VOS, F. E.; SCHOLLUM, J. B.; COULTER, C. V.; MANNING, P. J.; DUFFULL, S. B. Assessment of markers of glycaemic control in diabetic patients with chronic kidney disease using continuous glucose monitoring. *Nephrology*, v.17, p.182-188, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva,2006. 46 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated report of a WHO consultation. Geneva, 2011. 25p.

ZHOU, Q.; SHI, D.; LV, L. The establishment of biological reference intervals of nontraditional glycemic markers in a Chinese population. *J Clin Lab Anal*, v.31, doi: 10.1002/jcla.22097. Epub 2016 Nov 17.

ANEXO I – PRIMEIRO ARTIGO

Fructosamine measurement in the diagnosis of diabetes mellitus – contribution of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil)

Running title: Fructosamine in diabetes diagnosis – ELSA-Brasil

William Pedrosa ^{a,b}, Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz ^c, Sandhi Maria Barreto ^d, Pedro Guatimosim Vidigal ^{e*}

^a Graduate Program in Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Hermes Pardini Laboratory, Belo Horizonte, Brazil.

^c Department of Internal Medicine, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

^d Department of Public Health, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^e Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding Author: Pedro Vidigal

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Avenida Professor Alfredo Balena, 190, sala 403, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 30130-100, Brazil, Phone: + 55 31 3409-9774, Fax: +55 -31-3409-9782, E-mail: pedrovidigal@ufmg.br

Declarations of interest: none.

ABSTRACT

Background: Fructosamine is traditionally used as monitoring test for diabetes mellitus. More recently, some studies have suggested it as a potential test for the diagnosis of diabetes. The aim of this study was to evaluate the use of fructosamine as a diabetes diagnostic test in a group of Brazilian subjects.

Methods: This is a cross-sectional study using baseline data of 2,228 participants from the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil). Criteria based on fasting plasma glucose (FPG), 2-h post-load plasma glucose (2-h PG), and glycated hemoglobin (HbA1c) was adopted. The correlation of fructosamine levels with FPG, 2-h PG, and HbA1c values was determined. The diagnostic performance of fructosamine and standard glycemic markers was evaluated by the area under the curve (AUC).

Results: The linear correlation of fructosamine was 0.26 (95% CI: 0.22-0.30) with FPG, 0.10 (95% CI: 0.06-0.14) with 2-hPG, and 0.22 (95% CI: 0.18-0.26) with HbA1c. According to ROC curve, fructosamine identified patients with diabetes regardless of the criterions adopted [AUC from 0.66 (95% CI: 0.64-0.68) to 0.74 (95% CI: 0.72-0.76); both $p < 0,001$).

Conclusions: Fructosamine correlates with standard glycemic tests and may be used to aid in diabetes diagnosis. Additional studies are necessary to confirm the potential role of fructosamine in this field.

Keywords: fructosamine, diabetes mellitus, diagnosis

List of Abbreviations

1,5-AG, 1,5-anhydroglucitol; 2-h PG, 2-h postload plasma glucose; HbA1c, Glycated hemoglobin; ADA, American Diabetes Association; ARIC, Atherosclerosis Risk in Communities; AUC, Area under the curve; BMI, Body mass index; CARMRI, Carotid Magnetic Resonance Imaging; ELSA-Brasil – Brazilian Longitudinal Study of Adult Health; FPG, Fasting plasma glucose; GA – Glycated albumin; IDF – International Diabetes Federation; OGTT – Oral glucose tolerance test; ROC – Receiving operator characteristic; SAH – Systemic arterial hypertension.

1. Introduction

According to the International Diabetes Federation (IDF), an estimated 642 million people will have diabetes mellitus worldwide by 2040, an increase of over 50% compared with the current figure [1,2]. Type 2 diabetes is the most prevalent category. Most of the time, it is a silent disease, the diagnosis being made possible only by the use of laboratory tests.

Current tests for diabetes diagnosis include fasting plasma glucose (FPG), 2-h post-load plasma glucose (2-h PG), and glycated hemoglobin (HbA1c), the latter being also currently the most accepted test for long-term monitoring of diabetes [3,4]. Although widely used in clinical practice, these tests have some notable limitations. FPG requires fasting, has low pre-analytical stability, and displays higher variability and more day-to-day variations from stress and physical activity than Alc. In oral glucose tolerance test (OGTT), preparation is required prior to the test and the patient must remain at the testing location for two hours; in addition, it has poorer reproducibility than FPG and HbA1c. Finally, HbA1c must be interpreted with caution in the presence of clinical conditions that affect red blood cells lifespan, different populations have different glycation rates, and results can be unreliable in people with inherited hemoglobin variants and in patients with chronic kidney disease and iron deficiency [5–8]. In this context, alternative tests may be useful when standard measures are not available or in situations of restriction to their use.

Fructosamine results from non-enzymatic glycation of proteins, and approximately 60–90% of fructosamine levels reflect albumin glycation. Fructosamine measurement with the nitroblue tetrazolium (NBT) colorimetric assay has been automated and is fast and inexpensive, requires no fasting, has good pre-analytical stability, and low biological coefficient of variation [11,12]. Because it represents the glycation of serum proteins, mostly albumin, fructosamine reflect glycemic control over the prior two to three weeks [13], although analysis of fructosamine

kinetics against preceding plasma glucose levels indicates that fructosamine reflects mean glycemia over up to 40 days [14]. These characteristics allow its use in situations for which the other tests are inappropriate, although fructosamine cannot be used in clinical studies in which there are changes in blood protein concentration [9–11].

The use of multiple markers for diabetes stems from the fact that each test has different diagnostic ability, as FPG, OGTT, and HbA1c have been shown to display different sensitivities and specificities [15]. Thus, fructosamine testing may add complementary information to standard serum markers and help improve the performance of laboratory tests in the diagnosis of diabetes [16]. Its dosage can be performed on serum samples and does not require dedicated equipment such as HbA1c, which lowers its cost and makes its evaluation important mainly in developing countries. Before its wide adoption, however, the correlation between results of fructosamine tests and those of the current standard diabetes diagnostic tests must be established for different populations, including Brazil.

Thus, this study aimed to evaluate the clinical usefulness of fructosamine for diabetes diagnosis in Brazilian population. We also evaluated the effect of epidemiological factors on fructosamine levels [17,18].

2. Materials and Methods

2.1 Study design and population

This cross-sectional study evaluated a subsample from one of the participating centers in the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil), a multicenter cohort study designed to assess the incidence and progression of diabetes and cardiovascular disease and their risk factors in Brazilian adults. The full sample of ELSA-Brasil comprises 15,105 active and retired civil servants aged 35–74 years, from six higher education institutions and research centers in six large cities from different regions of Brazil (Belo Horizonte, Porto Alegre, Rio

de Janeiro, Salvador, São Paulo, and Vitória). Detailed information about the ELSA-Brasil design and cohort profile can be found elsewhere [19,20]. Fructosamine testing was conducted in 2,288 of 3,115 participants from one ELSA Brazil investigation center (Belo Horizonte, state of Minas Gerais). All ELSA-Brasil participants were initially eligible for the study. The exclusion criteria were current or recent (within the past four months) pregnancy, severe cognitive or linguistic impairment, intention to leave the job in the near future, and, if retired, residing outside the corresponding metropolitan region. All participants answered a questionnaire about their health condition, comorbidities, medication use, and lifestyle behaviors including physical activity and alcohol use. Baseline data were collected between 2008 and 2010.

ELSA-Brasil was approved by the research ethics committee at the six participating institutions and all participants provided written consent to participate in the study.

2.2 Biochemical analyses

Blood samples were collected after a 12 hour fasting. All participants were submitted to OGTT, excepting those previously diagnosed with diabetes. Serum samples were aliquoted and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. FPG and 2-h PG were measured by the hexokinase method on an ADVIA[®] Chemistry automated analyzer (Siemens Deerfield, IL, USA). HbA1c was measured using a high-performance liquid chromatography assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) certified by the National Glycohemoglobin Standardization Program (NGSP). Fructosamine was measured by the nitroblue tetrazolium (NBT) colorimetric assay (BioSystems S.A. Costa Brava, Barcelona, Spain), using an AU 5800 automated analyzer (Beckman Coulter, USA) with an interassay coefficient of variation $\leq 5.3\%$ [21].

2.3 Case definitions

Diabetes was defined as HbA1c \geq 6.5% (48 mmol/mol), or FPG \geq 126 mg/dL (7.0 mmol/L), or 2-h PG \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L) according to American Diabetes Association (ADA) criteria [3], or by self-report of previous diagnosis of diabetes, or by the use of diabetes medication in the last two weeks. A subgroup termed ‘recent diabetes’ included participants who fit the ADA criteria, but excluded participants diagnosed with diabetes by self-report or use of diabetes medication. Systemic arterial hypertension (SAH) was defined as the use of antihypertensive medication in the last two weeks, or an average systolic blood pressure (BP) \geq 140 mmHg or diastolic blood pressure \geq 90 mmHg (from three BP measures). Body mass index (BMI) was calculated as the ratio of body weight (kg) to squared height (m²). Study participants were asked to identify their racial background and/or skin color as black, brown, Asian, native Brazilian, or white.

2.4 Statistical analysis

Data are reported as median with interquartile range and frequencies. Pairwise group comparisons were performed using the Mann-Whitney U test or the Chi-square test. Spearman’s correlation coefficient was calculated to determine the relationship between the variables. Receiving operator characteristic (ROC) analyses were conducted, and the area under the curve (AUC) with 95% confidence intervals was estimated to investigate the clinical usefulness of fructosamine considering diabetes diagnosed by the other tests in the ‘recent diabetes’ subgroup. The distribution of percentiles for fructosamine, HbA1c, FPG, and 2-h PG were established in the whole group. All analyses were performed using MedCalc for Windows version 16.4.3 (MedCalc Software, Ostend, Belgium). A two-tailed P of less than 0.05 was considered statistically significant.

3. Results

Table 1 presents the characteristics of the participants. Of 2,288 participants, 379 (16.6%) had diabetes. Participants with diabetes were mostly (60.7%) older men and had higher BMI and higher prevalence of hypertension than participants without diabetes ($p < 0.001$, all). Mean levels of all glycemic markers (FPG, 2-h PG, HbA1c, and fructosamine) were higher in the group with diabetes, and 161 individuals reported previous diabetes diagnosis or the use of diabetes medication, whereas 218 participants were diagnosed in the study (recent diabetes group). Self-reported diabetes participants were older, had higher systemic arterial hypertension (SAH) prevalence, and had higher levels of glycemic markers (FPG, HbA1c, and fructosamine) than participants in the recent diabetes group ($p < 0.001$, all).

Fructosamine had similar correlations with FPG ($r = 0.26$) and HbA1c ($r = 0.22$), but a lower correlation with 2-h PG ($r = 0.10$) for the entire sample (all $p < 0.001$). In recent diabetes group, the correlation coefficients of fructosamine with FPG, HbA1c and 2-h PG were 0.47 ($p < 0.001$), 0.19 ($p = 0.006$) and 0.28 ($p < 0.001$) respectively.

In the whole group, an FPG value of 126 mg/dL (7.0 mmol/L) corresponded to the 88th percentile, an HbA1c value of 6.5% (48 mmol/mol) corresponded to the 92nd percentile, and a 2-h PG value of 200 mg/dL (11.1 mmol/L) corresponded to the 93rd percentile. The fructosamine concentrations for the corresponding percentiles were 251, 257, and 259 $\mu\text{mol/L}$, respectively.

Table 1. Participant characteristics for the entire sample and stratified by diabetes diagnosis.^a

| | Pooled data (N=2288) | Without Diabetes (N=1909) | With Diabetes (N=379) ^b |
|--|-------------------------|------------------------------|---------------------------------------|
| Age (years) | 52 (46–59) | 51 (45–57) | 57 (51–63) |
| Men (%) | 48.3 | 45.9 | 60.7 |
| Self-reported race/ethnicity (%) (n=2259) | | | |
| White | 49.4 | 51.2 | 40.7 |
| Brown | 35.6 | 35.3 | 36.7 |
| Black | 12.2 | 10.8 | 19.1 |
| Asian/Indigenous | 2.8 | 2.7 | 3.5 |
| BMI (kg/m ²) | 26.0 (23.5–29.1) | 25.6 (23.3–28.4) | 28.3 (25.2–31.1) |
| Hypertension (%) | 35.5 | 30.2 | 62.0 |
| Fasting glucose | | | |
| (mg/dL) | 105 (98–113) | 103 (97–109) | 132 (120–157) |
| (mmol/L) | 5.8 (5.4–6.3) | 5.7 (5.4–6.1) | 7.3 (6.7–8.7) |
| HbA1c (glycated hemoglobin) | | | |
| (%) | 5.2 (4.9–5.7) | 5.1 (4.9–5.5) | 6.1 (5.5–7.0) |
| (mmol/mol) | 33 (30–39) | 32 (30–37) | 43 (37–53) |
| Fructosamine (μmol/L) | 223 (210–237) | 220 (209–233) | 237 (221–258) |
| 2-h postload glucose (n=2081) | | | |
| (mg/dL) | 124 (105–148) | 120 (103–140) | 209 (174–244) |
| (mmol/L) | 6.9 (5.8–8.2) | 6.7 (5.7–7.8) | 11.6 (9.7–13.5) |

^aEstimates reported as median (interquartile range) or %.

^bDiabetes defined as any of the following: HbA1c \geq 6.5%, fasting glucose \geq 126 mg/dL, 2-h postload glucose \geq 200 mg/dL, or self-report of previous diagnosis or use of diabetes medication.

To convert glucose concentrations from mg/dL to mmol/L, multiply by 0.05551; HbA1c values from % to mmol/mol, multiply by 10.93 and subtract 23.5.

The performance of fructosamine measurement as a diagnostic test for diabetes mellitus was based on four diagnostic criteria for diabetes (FPG \geq 126 mg/dL [7.0 mmol/L], 2-h PG \geq 200 mg/dL [11.1 mmol/L], HbA1c \geq 6.5% [48 mmol/mol], or any of these criteria], considering only recent diabetes cases (those diagnosed in the study). Table 2 shows the AUCs for fructosamine.

Table 2. Performance of fructosamine for groups 1 to 4 in detecting diabetes defined by different diagnostic criteria (with 95% confidence interval). Participants with self-report of previous diabetes diagnosis were excluded from the analysis.

| | Group 1 ^a (n=2124) | Group 2 ^b (n=2124) | Group 3 ^c (n=2079) | Group 4 ^d (n=2124) |
|--------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Area Under the Curve | 0.66 (0.64–0.68) | 0.74 (0.72–0.76) | 0.68 (0.66–0.7) | 0.7 (0.68–0.72) |
| Sensitivity ^f | 62.2 (55.4–68.7) | 74.8 (66.3–82.1) | 67.2 (58.5–75.0) | 45.8 (32.7–59.2) |
| Specificity ^f | 63.5 (61.2–65.6) | 60.4 (58.2–62.5) | 62.5 (60.3–64.7) | 87.1 (85.5–88.5) |

^aAny of the following: FPG \geq 126 mg/dL (5.6 mmol/L); 2-h PG \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L); HbA1c \geq 6.5% (48 mmol/mol).

^bFPG (fasting plasma glucose) \geq 126 mg/dL (5.6 mmol/L).

^c2h-PG (2-h postload glucose) \geq 200 mg/dL (11.1 mmol/L).

^dHbA1c (glycated hemoglobin) \geq 6.5% (48 mmol/mol).

^en = 2079.

^fCut-offs (μ mol/L) were 226 (groups 1 and 3), 244 (group 4) and 225 (group 2)

All participants were assigned to either White or non-White ethnicity because no significant differences in fructosamine levels were detected across non-White participants (data not shown). Fructosamine levels were significantly higher in the non-White group ($p < 0.001$), even when stratified by the presence ($p = 0.002$) or absence ($p = 0.027$) of diabetes diagnosis, or when compared to participants with normal test results for the other three glycemic markers (FPG $<$ 100 mg/dL [5.6 mmol/L], 2-h PG $<$ 140 mg/dL [7.8 mmol/L], and HbA1c $<$ 5.7% [39 mmol/mol]) ($p = 0.003$). A similar pattern was detected for glycated hemoglobin.

Fructosamine levels were significantly higher in men with ($p=0.001$) or without ($p<0.001$) diabetes than in women or in participants with all normal results for glycemic markers ($p<0.001$), but were significantly lower in participants with $\text{BMI} \geq 30 \text{ kg/m}^2$ than in participants with $\text{BMI} < 30 \text{ kg/m}^2$ ($p=0.008$). Fructosamine levels correlated negatively with BMI ($r=-0.08$, $p<0.001$) and positively with age both for persons with and without diabetes (pooled data, $p<0.001$), but there was no correlation when data for participants with normal glucose metabolism were analyzed separately ($p=0.117$).

4. Discussion

In this cross-sectional study, we investigated the relationship of fructosamine measurements and standard tests for DM diagnosis in a subsample of the ELSA-Brasil cohort. Fructosamine correlated significantly with FPG, HbA1c, and 2-h PG, but its correlation was stronger with FPG and HbA1c than with 2-h PG. Other findings were reported in similar studies [17,18,22,23]. Shima et al. measured glycemic markers in 302 adults, and reported a much stronger correlation of fructosamine and FPG in subjects with diabetes ($\text{FPG} \geq 140 \text{ mg/dL}$ [7.8 mmol/L]) than in subjects with $\text{FPG} < 140 \text{ mg/dL}$ (7.8 mmol/L) (0.79 vs. 0.26). In that same study, the correlation of fructosamine and 2-h PG was 0.71 in subjects with $2\text{-h PG} \geq 200 \text{ mg/dL}$ (11.1 mmol/L) [22]. The ARIC Carotid Magnetic Resonance Imaging (CARMRI) study [17] examined a subset of 1,719 participants from the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) cohort using similar diagnostic criteria as the current study, and detected significant correlations of fructosamine with FPG ($r=0.33$) and HbA1c ($r=0.40$). Nonlinear correlation models revealed higher coefficients of determination in that study, underscoring the nonlinear relationship between markers [17]. In a cross-sectional and longitudinal study of adults that attended the ARIC ($n=12,306$), Selvin et al. found higher correlation coefficients between fructosamine and FPG ($r=0.81$) and fructosamine and HbA1c ($r=0.82$) in the entire sample, including participants with and without diabetes [23]. Malmström et al. evaluated 10,987 participants aged 2–70 years

from the AMORIS cohort and found linear correlation coefficients of 0.75 and 0.78 for the association of fructosamine with FPG and HbA1c, respectively, in the entire cohort [18]. In a Spanish study that analyzed samples from 20,114 patients, the correlations of fructosamine with FPG and HbA1c were 0.60 and 0.78, respectively [24].

Despite being significant, the correlations detected for the entire cohort in the current study were lower than those reported in some but not all studies. Factors that alter correlation coefficients such as sample size and proportion of persons with diabetes may be responsible for this [17,18,22-24]. The difference in results across studies may also be secondary to the choice of either Spearman's or Pearson's correlation coefficients, which usually depends on the distribution of data. Spearman's correlation should preferably be used with non-normally distributed data [25].

Differences in glycation levels across populations may also explain the differences in the strength of the correlation between fructosamine and other glycemic markers. In our study, fructosamine levels were significantly higher in self-reported non-White participants, and this difference remained significant when data were analyzed separately for participants without diabetes and participants with normal test results for all glycemic markers. Similarly, fructosamine and HbA1c levels are higher in US Blacks than Whites [17,26]. Thus, race/ethnicity may confound the correlation of fructosamine with other glycemic markers.

Two other findings of the current study have also been reported in previous studies. Juraschek et al. also reported higher fructosamine concentration in men [17], and a study that evaluated 222 US-based African immigrants also found a negative correlation between BMI and fructosamine levels [27]. In the latter study, the authors proposed the hypothesis that chronic inflammation associated with obesity leads to rapid turnover of albumin [27].

The AUCs of fructosamine were significant for diagnosing diabetes when diagnosis was defined by FPG, 2-h PG, HbA1c, or any marker alone. Depending on the criteria adopted, the AUC of fructosamine in our study ranged from 0.66 to 0.74. Malmström et al. (2014) showed that discrimination of subjects with and without diabetes across the range of fructosamine levels was excellent (AUC=0.91) in a Swedish cohort. Based solely on fasting glucose levels, the AUCs for fructosamine (AUC=0.91) and HbA1c (AUC=0.90) were similar, and the AUC for fructosamine was 0.96 when both FPG and HbA1c criteria for diabetes were met [18]. In the American population, the AUCs were lower and more similar to the values observed in the Brazilian population: when diabetes was defined solely by HbA1c and FPG, the AUCs were 0.69 and 0.77, respectively [17]. In the current study, the AUCs for diagnosing diabetes by FPG and HbA1c criteria were 0.74 and 0.70, respectively. In addition, the ability of HbA1c and fructosamine to detect diabetes defined by 2-h PG was similar in a US-based African cohort [27]. Rodríguez-Segade et al. found similar AUCs for fructosamine when diabetes was defined by HbA1c (AUC=0.88) or FPG (AUC=0.82) [24].

In our study, a fructosamine value between 251 and 259 corresponded to the cutoff values obtained from the percentiles of the standard diagnostic tests. Selvin et al. reported that fructosamine values $> 264 \mu\text{mol/L}$ were associated with increased risk of developing diabetic retinopathy and chronic kidney disease, and 241–264 $\mu\text{mol/L}$ values were associated with self-reported diabetes diagnosis or use of diabetes medications [23].

Other alternative markers of hyperglycemia have been evaluated in conjunction with fructosamine in the diagnosis of diabetes and assessment of glycemic control [28,29]. 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG) is a six-carbon monosaccharide derived mainly from food that reflects average glucose levels over the prior 2–14 days. Glycated albumin (GA) comprises nearly all of fructosamines and assay methods for measuring GA have also been described. GA and fructosamine reflect mean glucose over the prior two to three weeks. Overall, the

performance of fructosamine in the diagnosis of diabetes and its association with microvascular complications has been described as intermediate to those of 1,5-AG and GA [29].

Important strengths of this study include the community-based multiethnic sample of people with and without diabetes and, to our knowledge, this is the largest study comparing fructosamine with standard serum markers for diabetes in Brazil. In addition, few studies have investigated the association of fructosamine with 2-h PG.

The limitations of our study include a lack of analysis in patients with kidney disease, which is a condition that may affect fructosamine levels and change the correlations with other glycemic tests [29,30]. Access to only a single measurement of each glycemic marker limited the diagnosis of diabetes to baseline, unlike current guidelines that recommend that the diagnosis of diabetes should be made on the basis of at least two test results conducted at different times [3,4].

The assay for measuring fructosamine is fast, technically simple, inexpensive, and amenable to automation. Fructosamine shows little within-subject biological variation and can be used for short-term glycemic control in diabetes management or in combination with glycated hemoglobin [10]. In addition, the fructosamine assay has been standardized and improved to reduce susceptibility to interferences [31]. Nevertheless, molecules with reducing activity may interfere with fructosamine measurements and pathologic conditions linked to hypoproteinemia and abnormal levels of immunoglobulins are more likely to affect fructosamine concentrations. These limitations of fructosamine measurement have been considered critical in patients with borderline results for glucose levels, which may help to explain the poor correlation of fructosamine in this group of individuals [28,32]. Besides that, interassay variability cannot be ruled out. In fact, assays from different manufacturers have been used for fructosamine testing [17,18,22]. In addition, albumin-corrected fructosamine levels offer little improvement to the

correlation with HbA1c and, possibly, to its diagnostic performance [24]. Nevertheless, we are unable to determine if such differences contributed to the conflicting results observed between studies.

5. Conclusion

In conclusion, fructosamine correlated with FPG, 2-h PG, and HbA1c measurements, including in persons with a previous diagnosis of diabetes. The fructosamine assay may be useful for the diagnosis of diabetes, especially when HbA1c measurement is not available or interpretation may be limited due to clinical conditions. Additional studies are necessary to establish the potential of fructosamine as a diabetes diagnostic test in relation to the other tests available.

Funding Source: The ELSA-Brasil baseline study was supported by the Brazilian Ministry of Health (Science and Technology Department) and the Brazilian Ministry of Science and Technology (FINEP/Financiadora de Estudos e Projetos and CNPq/National Research Council), grants 01 06 0010.00 RS, 01 06 0212.00BA, 01 06 0300.00 ES, 01 06 0278.00 MG, 01 06 0115.00SP, 01 06 0071.00 RJ.

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.

Acknowledgements: The authors thank ELSA-Brasil staff and participants for their important contributions. The study was supported by the Brazilian Ministry of Health (Science and Technology Department DECIT) and the Brazilian Ministry of Science and Technology

(FINEP, Financiadora de Estudos e Projetos and CNPq, National Research Council). SMB is a research fellow of the National Research Council (CNPq, grant no. 300159/99-4).

Authors' contributions

William Pedrosa drafted the manuscript and performed the statistical analysis. Maria Diniz and Sandhi Barreto participated in the design of the study. Maria Diniz helped to draft the manuscript. Pedro Vidigal conceived the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- [1] Narayan KM, Type 2 diabetes: why we are winning the battle but losing the war? 2015 Kelly West Award Lecture, *Diabetes Care*. 39 (2016) 653-663.
- [2] International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 7th ed. <http://www.diabetesatlas.org/> (accessed: 16 March 2017).
- [3] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. Position Statement. American Diabetes Association, *Diabetes Care*. 36 (2013) 36 Suppl:S67-S74.
- [4] World Health Organization (2011). Use of glycated haemoglobin (HbA1c) in the diagnosis of diabetes mellitus. Abbreviated report of a WHO consultation. WHO/NMH/CHP?CPM/11.1.
- [5] Sacks DB, HbA1c versus glucose testing, a comparison, *Diabetes Care*. 34 (2011) 518-523.
- [6] Bonora E, Tuomilehto J, The pros and cons of diagnosing diabetes with A1c, *Diabetes Care* 34 (2011) Suppl:S184-S190.
- [7] Sacks DB, Hemoglobin A1c in diabetes: panacea or pointless?, *Diabetes*. 62 (2013) 41-43.
- [8] Cavagnoli GC, Pimentel AL, Freitas PA, Gross JL, Camargo JL, Factors affecting A1c in non-diabetic individuals: review and meta-analysis, *Clin Chim Acta*. 445 (2015) 107-114.
- [9] Cohen R, Sacks DB, Comparing multiple measures of glycemia: how to transition from biomarker to diagnostic test? [Editorial], *Clin Chem*. 58 (2012) 1615-1617.

- [10] Montagnana M, Paleari R, Danese E, Salvagno GL, Lippi G Guidi GC, et al, Evaluation of biological variation of glycated albumin (GA) and fructosamine in healthy subjects, *Clin Chim Acta.* 423 (2013) 1-4.
- [11] Cockram CS, Pui PC, Keung CC, Moon YS, Swaminathan R, A comparison of fructosamine and glycosylated haemoglobin measurements at a diabetic clinic, *Diabetes Res Clin Pract.* 9 (1990) 43-48.
- [12] Shleicher ED, Vogt BW, Standardization of serum fructosamine assays, *Clin Chem.* 36 (1990) 136-139.
- [13] Ambruster DA, Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness, *Clin Chem.* 33 (1987) 2153-2163.
- [14] Tahara Y, Shima K, Kinetics of HbA1c, glycated albumin, and fructosamine and analysis of their weight functions against preceding plasma glucose level, *Diabetes Care.* 18 (1995) 440-447.
- [15] Cowie CC, Rust KF, Byrd-Holt DD, Gregg EW, Ford ES, Geiss LS et al, Prevalence of diabetes and high risk for diabetes using A1c criteria in the U.S. population in 1988-2006, *Diabetes Care.* 33 (2010) 562-568.
- [16] Ko GT, Chan JC, Yeung VT, Chow C, Tsang LW, Li JK et al, Combined use of a fasting plasma glucose concentration and HbA1c or fructosamine predicts the likelihood of having diabetes in high-risk subjects, *Diabetes Care.* 21 (1998) 1221-1225.
- [17] Juraschek SP, Steffes MW, Selvin E, Associations of alternative markers of glycemia with hemoglobin A1c and fasting glucose, *Clin Chem.* 58 (2012) 1648-1655.
- [18] Malmström H, Walldius G, Grill V, Jungner I, Gudbjörnsdóttir S, Hammar N, Fructosamine is a useful indicator of hyperglycemia and glucose control in clinical and epidemiological studies – cross-sectional and longitudinal experience from the AMORIS cohort, *PLoS One.* 9 (2014) e111463.

- [19] Aquino EM, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB et al, Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil): objectives and design, *Am J Epidemiol.* 175 (2012) 315-324.
- [20] Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM et al, Cohort profile: longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil), *Int J Epidemiol.* 44 (2015) 68-75.
- [21] Fedeli LG, Vidigal PG, Leite CM, Castilhos CD, Pimentel RA, Maniero VC et al, Logistics of collection and transportation of biological samples and the organization of the central laboratory in the ELSA-Brasil, *Rev Saúde Pública.* 47 (2013) Suppl:S1-S9.
- [22] Shima K, Abe F, Chikakiyo H, Ito N, The relative value of glycated albumin, hemoglobin A1c and fructosamine when screening for diabetes mellitus, *Diabetes Res Clin Pract.* 7 (1989) 243-250.
- [23] Selvin E, Rawlings AM, Grams M, Klein R, Sharrett AR, Steffes M, Coresh J, Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complication: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study, *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2 (2014) 279-288.
- [24] Rodríguez-Segad S, Rodríguez J, Camiña F, Corrected fructosamine improves both correlation with HbA1c and diagnostic performance, *Clin Biochem.* 50 (2017) 110-115.
- [25] Bishara AJ, Hittner J, Testing the significance of a correlation with nonnormal data: comparison of Pearson, Spearman, transformation, and resampling approaches, *Psychol Methods.* 17 (2012) 399-417.
- [26] Selvin E, Steffes MW, Ballantyne CM, Hoogeveen RC, Coresh J, Brancati FL, Racial differences in glycemic markers: a cross-sectional analysis of community-based data, *Ann Intern Med.* 154 (2011) 303-309.

- [27] Summer AE, Duong MT, Aldana PC, Ricks M, Tulloch-Reid MK, Lozier JN et al, A1c combined with glycosylated albumin improves detection of prediabetes in africans: the africans in American Study, *Diabetes Care*. 39 (2016) 271-277.
- [28] Parrinello CM, Selvin E, Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycaemic markers in diabetes diagnosis, prognosis, and management, *Curr Diab Rep*. 14 (2014) 548.
- [29] Danese E, Montagnana M, Nouvenne A, Lippi G, Advantages and pitfalls of fructosamine and glycosylated albumin in the diagnosis and treatment of diabetes, *J Diabetes Sci Technol*. 92 (2015) 169-176.
- [30] Chen H, Wu T, Lin H, Jap T, Hsiao L, Lee S, Lin S, Hemoglobin A1c and Fructosamine for assessing glycaemic control in diabetic patients with CKD stages 3 and 4, *Am J Kidney Disease*. 55 (2010) 867-874.
- [31] Cefalu WT, Bell-Farrow AD, Petty M, Iziar C, Smith JA, Clinical validation of a second-generation fructosamine assay, *Clin Chem*. 37 (1991) 1252-1256.
- [32] Shleicher ED, Mayer R, Wagner EM, Gerbitz K, Is serum fructosamine assay specific for determination of glycosylated serum protein?, *Clin Chem*. 34 (1988) 320-323.

ANEXO II – SEGUNDO ARTIGO

Establishing a blood fructosamine reference range for the Brazilian population based on data from ELSA – Brasil

Authors

William Pedrosa

Postgraduate Program in Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Hermes Pardini Laboratory, Belo Horizonte, Brazil.

Maria de Fátima Haueisen Sander Diniz

Postgraduate Program in Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

Sandhi Maria Barreto

Department of Public Health, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Pedro Guatimosim Vidigal

Department of Clinical Pathology, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. Avenida Professor Alfredo Balena, 190, sala 403, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 30130-100, Brazil, Phone: + 55 31 3409-9774, Fax: +55 31 3409-9782, E-mail: pedrovidigal@ufmg.br

ABSTRACT

Objectives

The fructosamine test is used in the monitoring of diabetes mellitus, particularly in cases with restrictions on the use of glycated hemoglobin (mainly in the setting of altered red blood cell lifespan and interference by hemoglobin variants). It could also provide additional information on shorter-term glycemic control. The objective of the study is to establish the reference range of the fructosamine in the Brazilian population.

Design and Methods

The reference interval was defined as suggested by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). The study participants were from a Brazilian cohort (The Longitudinal Study of Adult Health – ELSA-Brasil) with baseline data collected between 2008 and 2010. A total of 466 subjects were selected after exclusion of diabetic individuals, and those with altered glycemic markers and renal function tests.

Results

The reference interval was 186 to 248 $\mu\text{mol/L}$ for women and 196 to 269 $\mu\text{mol/L}$ for men. Fructosamine levels were higher in men than in women ($p = 0.006$) and in the non-white population ($p = 0.034$) and had a negative correlation with the body mass index ($r = -0.117$; $p = 0.011$).

Conclusions

The reference intervals for fructosamine were affected by sex. Reference intervals stratified by sex would be more adequate in the interpretation of the fructosamine test.

Keywords: fructosamine; reference interval; diabetes mellitus

Nonstandard Abbreviations

IDF, International Diabetes Federation; 1,5 AG , 1,5-anhydroglucitol; A1c, Glycate Hemoglobin; FPG, Fasting Plasma Glucose; 2-h PG, 2 hours post glucose load; OGTT, Oral Glucose Tolerance Test; NBT, Nitroblue Tetrazolium Method; CLSI, Clinical and Laboratory Standard Institute; BMI, Body Mass Index

Establishing a blood fructosamine reference range for the Brazilian population based on data
from ELSA – Brasil

1 - Introduction

The International Diabetes Federation (IDF) estimates that more than 600 million people will be diabetic by 2040, making diabetes a leading cause of mortality and morbidity. In Brazil, the number of individuals with diabetes increased by 62% over the past ten years, and the disease now affects approximately 9% of the population [1,2].

Traditional markers used in diabetes diagnosis and monitoring include fasting plasma glucose (FPG), two-hour plasma glucose (2-hPG) measured during the oral glucose tolerance test (OGTT), and glycated hemoglobin (A1c) levels [3]. More recently, healthcare professionals have increasingly used other markers of hyperglycemia, such as 1,5-anhydroglucitol (1,5-AG), glycated albumin and fructosamine levels [4].

The 1,5-AG and glycated albumin tests are rarely used in Brazil, in contrast to fructosamine test. Fructosamine levels provide information about an individual's glycemic levels over a period of two to three weeks [5]. Our work aimed at defining the first reference range for the Brazilian population.

2 - Materials and Methods

2.1 - Population

The Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil) aims to identify risk factors, and to assess the incidence and progression of cardiovascular diseases and diabetes mellitus in multicenter cohort of Brazilians. The baseline data were collected from 2008 to 2010 from a cohort and included 15,105 active and retired public servants aged 35 to 74 years of age, who worked in research institutions or universities in six Brazilian capitals. The following

conditions were considered exclusion criteria: current pregnancy, pregnancy in the previous four months, severe cognitive or communication deficits, intention to leave the job in the near future, or, if retired, intention to move from the current metropolitan area.

The present study was conducted in participants of ELSA-Brasil residing in Belo Horizonte, state of Minas Gerais. The total number of samples collected in the city was 3,115, from which 2,288 were available for fructosamine testing. We excluded from the study individuals with a previous history of diabetes (n=161), with FPG \geq 5.6 mmol/L (100 mg/L) and/or 2-hPG \geq 7.8 mmol/L (140 mg/dL) and/or A1c \geq (38.8 mmol/mol) (5.7%) (n= 1804). In addition, we excluded individuals with microalbuminuria \geq 20 μ g/min (n=2) and creatinine $>$ 114.9 μ mol/L (1.3 mg/dL) (n=57). Overlap of exclusion criteria occurred for some individuals. The body mass index (BMI) was calculated as the weight in kg divided by height in meters raised to the power of two. Study participants were asked to identify their racial background and/or skin color as black, brown, Asian, native Brazilian, or white. All participants signed an informed consent form and the research protocol was approved by the Ethics Committee of each institution, as well as by the National Commission on Research Ethics [6,7].

Samples were collected after a 12-h fasting period. The OGTT was conducted in all participants included in the present study. Samples were stored at -80° C. Serum fructosamine levels were determined by the colorimetric method (NBT – BioSystems S.A. Costa Brava, Barcelona, Spain) in an automatic analyzer (AU 5800, Beckman Coulter, USA) with a variation coefficient \leq 5.3%.

2.2 - Statistics

The reference range was defined as per the Clinical and Laboratory Standards Institute C28-A3c standard (CLSI), with 2.5 and 97.5 percentiles as the lower and upper limits, respectively. The sample was evaluated according to the presence of Dixon (with criteria of Reed) and Tukey

outliers. The generation of the reference interval was performed by non-parametric technique. The percentiles were calculated as the observations corresponding to rank $r=p*(n+1)$. For the 90% confidence intervals of the reference limits we followed the CLSI guidelines and conservative confidence intervals were calculate using integer ranks. The evaluation for the data partition was performed by the Harris & Boyd method. [8,9]. Continuous variables with a normal distribution (Shapiro-Wilk Test) were expressed as mean and standard deviation; otherwise, variables were expressed as median and interquartile range. The T-test, Mann-Whitney and chi-squared tests were used for comparisons between two groups. Kruskal-Wallis was used in comparisons among three or more groups. Multiple linear regression analysis was used to assess the influence of different variables on blood fructosamine levels. Spearman's correlation was adopted for quantitative variables. Tests were run on MedCalc for Windows, version 18 (MedCalc, Ostend, Belgium).

3 - Results

The number of study participants was 466, and Table 1 shows the characteristics of this group. Women had higher mean age than men, but no differences existed in the distribution between genders of self-indicated race/skin color and BMI. No differences in fructosamine levels were found among self-indicated race/skin color groups ($p=0.185$). However, when the sample was divided into whites and non-whites, fructosamine levels were higher among non-whites ($p=0.034$). Men had higher blood fructosamine than women ($p<0.001$). Overall, fructosamine levels were negatively correlated with BMI ($r=-0.117$; $p=0.011$). Although age showed no correlation to fructosamine concentration, it was included in the multiple regression model, which was significant ($p<0.001$, adjusted correlation coefficient 0.108). Significant variables included gender, self-indicated race/skin color and BMI; whereas age showed no significance in the model. Gender, BMI ($< 25 \text{ kg/m}^2$ versus $\geq 25 \text{ kg/m}^2$) and self-indicated race/skin color (whites versus non-whites) were separately evaluated according to Harris-Boyd criteria (CLSI)

for the stratification of reference ranges. Only gender warranted stratification of the range. No outlier was observed in the sample before and after stratification by sex. After stratification by sex, BMI and self-indicated race/skin color were evaluated within each gender group. However, differences were not significant and did not warrant another level of stratification. Table 2 displays the reference ranges we defined, as well as other ranges established in previous studies using the colorimetric method (second generation NBT) [10-16].

4 - Discussion

The reference ranges proposed here include lower fructosamine concentrations when compared to those established in other previous studies. These reference ranges generated in different populations are available in table 2, as well as information about the sample selection criteria, kit manufactures and statistical evaluation (when available). Several factors may account for the differences. Each study adopted very distinct inclusion and exclusion criteria, such as the use of FPG alone as a marker [12,14]; the use of FPG and 2-hPG as the only markers [10,13]; and the use of A1c alone as a marker [11]. Moreover, each study used different levels of these markers to determine the exclusion of participants. We used three tests of glycemic metabolism, and only individuals with normal levels in all three were included in the study, which could explain the lower fructosamine levels found in our study participants. Both Chen and colleagues [13] and Zhou and colleagues [14] applied other clinical and laboratorial variables as exclusion criteria. Selvin and colleagues [15] had results similar to ours. These authors excluded diabetic individuals from their study, as well as those with elevated hepatic enzymes, thyroid dysfunction, hypertension, and smokers. The authors reported, however, that the exclusion of diabetics had the greatest impact on reported ranges.

Differences among studies may also emerge from the use of different kits. In the present work, we used the BioSystems kit and an automatic analyzer AU580 (Beckman Coulter). None of the

other reports listed on table 2 used this combination: all of them used the Roche Diagnostics kit in different Roche analyzers.

Finally, regarding the statistical evaluation, not all studies had a systematic approach to the establishment of ranges. However, all authors adopted the 2.5 and 97.5 percentiles as limits, except for Cefalu and colleagues [11], who set the limit at 95 percentile only. Two of the studies did not evaluate the need for range stratification [11,12]. Among the variables assessed here, only gender warranted a stratification of the range. Four other studies [10, 13-15] evaluated but did not find the need for stratification. Chen and colleagues [13] found that different age groups required distinct ranges, in contrast to our findings. Much like observed in other work [10,15], we only evaluated individuals with ≥ 35 years-old, which limited our ability to identify ranges for other age groups. Zhou and colleagues worked with younger individuals. However, the median age in their study was similar to ours and they used a different tool (Lahti's algorithm) to evaluate the need for data stratification [14]. Selvin and colleagues used histograms and forest plots. We, in turn, stratified the range according to Harris-Boyd and the CLSI document [8,9].

Here, we assessed the need for specific ranges for different BMI groups. Chen and colleagues [13] only evaluated individuals with normal BMI. Much as observed by Selvin and colleagues [15], we found lower fructosamine concentrations in study participants with high BMI. Previous work found elevated levels of fructosamine among black individuals [15]. Evaluation of fructosamine concentration according to race (or skin color) is not usually reported. The reasons could be the lack of miscegenation in some populations, the unavailability of the information about the race. In Brazil, due to the great miscegenation, we find it is very difficult to evaluate individuals according to race. In the present study, individuals whose self-indicated race/skin color as non-white had higher fructosamine levels than white individuals.

The present work has limitations that include the sample size, which does not allow us to extrapolate results to the general population. Originally, our population was not selected for the construction of a reference interval. As a convenience sample, its applicability may be reduced for the general population. Moreover, albumin serum levels were not available, and low albumin levels are known to affect fructosamine concentration. In healthy individuals this effect on fructosamine is minor and has little impact on test results [15,16]. In addition, we only included in the study individuals with normal creatinine and microalbuminuria, which certainly restricted the inclusion of individuals with hypoalbuminemia. The tests currently used for the diagnosis and follow-up of DM had their association classically established with clinical outcomes. In addition, they have international standardization and international harmonization. More recently, high concentrations of fructosamine have been related to microvascular complications of DM [17]. However, more information is still needed to establish a better correlation between the levels of fructosamine and the clinical outcomes of DM. In addition, the test of fructosamine lacks standardization to more widespread use.

This study represents the first effort to establish a reference range for fructosamine levels in the Brazilian population. Our report, which used the ELSA-Brasil baseline as a source of data, might contribute to future work on the diagnosis and monitoring of DM, especially in situations when A1c and OGTT cannot be used.

Funding Source: The ELSA-Brasil baseline study was supported by the Brazilian Ministry of Health (Science and Technology Department) and the Brazilian Ministry of Science and Technology (FINEP/Financiadora de Estudos e Projetos and CNPq/National Research Council), grants 01 06 0010.00 RS, 01 06 0212.00BA, 01 06 0300.00 ES, 01 06 0278.00 MG, 01 06 0115.00SP, 01 06 0071.00 RJ.

5 - References

- 1 – International Diabetes Federation: IDF Diabetes Atlas, 7th ed. Available at <http://www.IDF.org/diabetesatlas>. Accessed: 25 Jan 2018.
- 2 – VIGITEL Brasil 2016. Ministério da Saúde, Distrito Federal 2017. Available at http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/junho/07/vigitel_2016_jun17.pdf. Accessed: 25 Jan 2018.
- 3 – Classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care in diabetes – 2018. Diabetes Care 41-Suppl (2018) S13-S27.
- 4 – Parrinello CM, Selvin E. Beyond HbA1c and glucose: the role of nontraditional glycemetic markers in diabetes diagnosis, prognosis and management. Curr Diab Rep 14 (2014) 548.
- 5 – Ambruster DA. Fructosamine: structure, analysis, and clinical usefulness. Clin Chem 33 (1987) 2153-2163.
- 6 - Aquino EM, Barreto SM, Bensenor IM, Carvalho MS, Chor D, Duncan BB et al. Brazilian longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil): objectives and design. Am J Epidemiol 175 (2012) 315-324.
- 7 - Schmidt MI, Duncan BB, Mill JG, Lotufo PA, Chor D, Barreto SM et al. Cohort profile: longitudinal study of adult health (ELSA-Brasil). Int J Epidemiol 44 (2015) 68-75.
- 8 – CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline – Third edition. CLSI document C28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.
- 9 – Harris EK, Boyd JC. On dividing reference data into subgroups to produce separate reference ranges. Clin Chem 36 (1990) 265-270.

- 10 – Baker J, Metcalf P, Scaragg R, Johnson R. Fructosamine test-plus, a modified fructosamine assay evaluated. *Clin Chem* 34 (1991) 522-556.
- 11 – Cefalu WT, Bell-Farrow AD, Pety M, Izlar C, Smith JA. Clinical validation of a second-generation fructosamine assay. *Clin Chem* 37 (1991) 1252-1256.
- 12 – Lin M, Hoke C, Ettinger B, Coyne R. Technical performance evaluation of BM/Hitachi 747-200 serum fructosamine assay. *Clin Chem* 42 (1996) 244-248.
- 13 – Chen X, Wu J, Li R, Wang Q, Tang Y, Shan X. The establishment of adult reference intervals on fructosamine in Beijing. *J Clin Lab Anal* 30 (2016) 1051-1055.
- 14 – Zhou Q, Shi D, Lv L. The establishment of biological reference interval f nontraditional glycemic markers in a Chinese population. *J Clin Lab Anal* 31 (2017). doi: 10.1002/jcla.22097. [Epub 2016 Nov 17].
- 15 – Selvin E, Warren B, He X, Sacks DB, Saenger AK. Establishment of community-based reference intervals for fructosamine, glycated albumin, and 1,5-anhydroglucitol. *Clin Chem* 64 (2018) 843-850.
- 16 – Rodríguez-Segade S, Rodríguez J, Camiña F. Corrected fructosamine improves both correlation with HbA1c and diagnostic performance. *Clin Biochem* 50 (2017) 110-115.
- 17 – Selvin E, Rawlings AM, Grams M, Klein R, Sharret AR, Coresh J. Fructosamine and glycated albumin for risk stratification and prediction of incident diabetes and microvascular complication: a prospective cohort analysis of the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) study. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2 (2014) 279-288.

Table 1: Laboratorial and clinical characteristics of the study sample, ELSA-Brasil (n=466)

| | Total | Males | Females | P-value |
|--------------------------------|------------------|------------------|------------------|---------|
| N | 466 | 145 (31.1) | 321 (68.9) | |
| Age (years) ^a | 48 (43-56) | 47 (42-54) | 49 (44-56) | 0.006 |
| Race/skin color ^{b,c} | | | | 0.240 |
| Black | 40 (8.6) | 9 (6.2) | 31 (9.7) | |
| Brown | 166 (35.6) | 59 (40.7) | 107 (33.3) | |
| White | 243 (52.1) | 73 (50.3) | 170 (53.0) | |
| Others ^d | 12 (2.6) | 2 (1.4) | 10 (3.1) | |
| BMI (kg/m ²) | | | | 0.853 |
| < 25 | 284 (60.9) | 91 (62.8) | 193 (60.1) | |
| 25 to < 30 | 143 (30.7) | 42 (29.0) | 101 (31.5) | |
| ≥ 30 | 39 (8.4) | 12 (8.3) | 27 (8.4) | |
| Fructosamine | 218 (207-230) | 226 (215-238) | 215 (205-207) | <0.001 |
| FPG (mmol/L) | 5.3 (5.1-5.4) | 5.3 (5.2-5.4) | 5.3 (5.1-5.4) | 0.017 |
| 2-h PG (mmol/L) | 5.9 (5.2-6.5) | 5.8 (5.1-6.5) | 5.9 (5.2-6.5) | 0.542 |
| A1c (mmol/mol) | 31 (28-34) | 31 (28-34) | 31 (28-34) | 0.763 |
| Creatinine | 79.6 (70.7-88.4) | 88.4 (79.6-97.2) | 70.7 (61.9-79.6) | <0.001 |
| (μmol/L) | | | | |
| Microalbuminuria | 0.093 | 0.094 | 0.093 | <0.001 |
| (μg/min) | (0.092-0.097) | (0.093-0.0102) | (0.092-0.095) | |

^aMedian and interquartile range; ^bSelf-indicated race/skin color; ^cAbsolute frequency (%);

^dAsians and native Brazilians; BMI= Body Mass Index; FPG= Fasting Plasma Glucose; 2-h PG= 2 hours post glucose load; A1c = Glycated Hemoglobin

Table 2: Blood fructosamine reference ranges estimated with second-generation nitroblue tetrazolium methodology.

| Reference | Sample | Range ($\mu\text{mol/L}$) | Kit and Analyzer | Comments |
|--------------------------------------|--|---------------------------------|--|--|
| Baker et al 1991 – New Zealand | 2,211 non-diabetics (FPG < 7.8 mmol/L ^a ; 2-hPG < 11.1 mmol/L; age 33-78 yrs; median age 47 yrs) | 202-296 | F. Hoffmann-La Roche/ Cobas- Fara | No need for stratification based on gender or age. |
| Cefalu et al 1991 – USA | 230 non-diabetics (A1c < 53 mmol/mol ^b ; age 18-70 yrs) | ≤ 289 | Roche Reagents/Cobas- Mira | Did not evaluate the need for stratification. |
| Lin et al 1996 – USA | 228 non-diabetics (FPG < 5.0 mmol/L) | 202-282 | Boehringer Mannheim/ Hitachi 747-200 | Did not evaluate the need for stratification. |
| Chen et al 2016 – China | 1,497 healthy individuals (FPG < 6,1 mmol/L; 2-hPG < 7.8 mmol/L; | 20-65 yrs 215-287 >65 yrs | Roche/Cobas 8000 | Evaluated the need for gender- and age-specific ranges. |

| | | | | |
|---|---|--|---|---|
| | normal BMI; age 20-85 yrs; 73.3% females) | 226-325 | | |
| Zhou et al 2016 – China | 458 individuals; (FPG 3.9-6.1 mmol/L; normal creatinine; age 20-79 yrs; median age 43 yrs; 50.7% females) | 220-298 | Roche/Roche Modular DPP | Evaluated the need for gender- and age-specific ranges. Did not find the need for them. |
| Selvin et al 2018 – USA | 1,799 non-diabetics (age 47-68 yrs; 51.4% females) | 195-258 | Roche/Roche Modular P800 | Evaluated the need for gender-age-, BMI- and race-specific ranges. |
| Pedrosa et al 2018 – Brasil (present study) | 466 individuals (normal FPG, A1c, 2-hPG; age 35-73 yrs; median age 48 yrs; 68.9% females) | Females ^c 186 -248 Males 196-269 | BioSystems S.A/AU 580 Beckman Coulter | Evaluated the need for gender-age-, BMI- and race-specific ranges. |

^aTo convert glucose concentrations from milimoles per liter to milligrams per deciliter, multiply by 18.

^bTo convert glycosylated hemoglobin from milimol per mol to %, multiply by 0.0915 and add 2.15 %.

^c90% confidence interval is 183-189 $\mu\text{mol/L}$ for the lower limit and 243-255 $\mu\text{mol/L}$ for upper limit.

^d90% confidence interval is 178-199 $\mu\text{mol/L}$ for the lower limit and 263-279 $\mu\text{mol/L}$ for upper limit.

Manufacturer's reference value interval for adults 205-285 $\mu\text{mol/L}$.

ANEXO III – COMPROVAÇÃO DE SUBMISSÃO PRIMEIRO ARTIGO

From: **Clinical Biochemistry** <EviseSupport@elsevier.com>

Date: qua, 7 de nov de 2018 01:41

Subject: Received resubmission CLB_2018_923

To: <pedrovidigal@ufmg.br>

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: CLB_2018_923

Title: Fructosamine measurement in the diagnosis of diabetes mellitus – contribution of the Brazilian Longitudinal Study of Adult Health (ELSA-Brasil)

Journal: Clinical Biochemistry

Dear Dr. Vidigal,

Thank you for resubmitting your manuscript for consideration for publication in Clinical Biochemistry. Your resubmission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_ACR=CLB and go to 'My Submissions'.

We appreciate your resubmitting your work to this journal.

Kind regards,

Clinical Biochemistry

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

ANEXO IV – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO SEGUNDO ARTIGO

From: **Practical Laboratory Medicine** <EviseSupport@elsevier.com>
Date: sex, 16 de nov de 2018 02:58
Subject: Your manuscript PLM_2018_117_R1 has been sent for review
To: <pedrovidigal@ufmg.br>

This message was sent automatically. Please do not reply.

Reference: PLM_2018_117_R1
Title: Establishing a blood fructosamine reference range for the Brazilian population based on data from ELSA - Brasil
Journal: Practical Laboratory Medicine

Dear Dr. Vidigal,

I am currently identifying and contacting reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer review is a voluntary service it can take time to find reviewers who are both qualified and available. While reviewers are being contacted, the status of your manuscript will appear in EVISE® as 'Reviewer Invited'.

Once a reviewer agrees to review your manuscript, the status will change to 'Under Review'. When I have received the required number of expert reviews, the status will change to 'Ready for Decision' while I evaluate the reviews before making a decision on your manuscript.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® and go to 'My Submissions'
via: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?JRNL_A CR=PLM

Kind regards,

Practical Laboratory Medicine

Have questions or need assistance?

For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

ANEXO V – APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 186/06

Interesse: Prof. (a) Sandhi Maria Barreto
Depto. De Medicina Preventiva e Social
Faculdade de Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 28 de junho de 2006 o projeto de pesquisa intitulado “**ELSA - Estudo longitudinal da saúde do adulto.**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Presidente do COEP/UFMG