

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

**AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DA ALBUMINA
HUMANA AO NÍQUEL E SUA POTENCIAL
APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DA ISQUEMIA
CARDÍACA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Sandra Huber da Silva

**Santa Maria, RS, Brasil
2010**

**AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA AO
NÍQUEL E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO
DA ISQUEMIA CARDÍACA**

por

Sandra Huber da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Análises Clínicas e Toxicológicas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco
Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos

Santa Maria, RS, Brasil
2010

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA AO NÍQUEL E
SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DA ISQUEMIA
CARDÍACA**

elaborada por
Sandra Huber da Silva

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Rafael Noal Moresco, Dr.
(Presidente/Orientador)

Marli Matiko Anraku de Campos, Dr^a.
(Co-orientadora)

Jarbas Rodrigues de Oliveira, Dr. (PUCRS)

Maria Beatriz Moretto, Dr^a. (UFSM)

Santa Maria, 16 de julho de 2010.

AGRADECIMENTOS

A Deus, nosso pai de infinita bondade, em me direcionar para amigos verdadeiros que encontrei nestes anos todos de caminhada.

A Jesus, por mostrar-me, através de seus sábios ensinamentos, a fé e a vontade de perseverar, mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus avós maternos, que já partiram, pelo carinho, amor e dedicação que me acolheram.

À tia Gelcy, minha tia-mãe, pelo amor, exemplo de superação e desprendimento de me acompanhar na minha infância com todo carinho e ainda auxiliar a criar meus filhos. Todo o meu respeito e amor a esta mulher que me ajudou a ser o que sou hoje.

Ao meu marido Renato por todo seu amor, carinho e paciência nesses anos de companheirismo. Sempre foi meu porto seguro, me apoiando em todos os meus projetos. Te amo muito!

Às minhas queridas e amadas filhas Aline e Natália, que Deus propiciou-me a bênção de tê-las em meu ventre. Não tenho palavras para demonstrar todo o meu amor e admiração por vocês! Agradeço todas as palavras de carinho e força. Às vezes até trocando de papel comigo quando era preciso. E ao Conrado amado, que foi mais um presente que Deus aninhou em meu ventre, obrigada pela compreensão de tantos dias sem dar atenção a ti.

A toda minha família, tanto material como espiritual, por sempre torcerem por mim.

Ao meu orientador, professor Dr. Rafael Noal Moresco, pela sua incansável dedicação, preocupação, respeito, compreensão, competência, reconhecimento e amizade. Obrigada pela orientação em todas as etapas deste trabalho, sempre com paciência e com o comprometimento necessário de um verdadeiro e incansável orientador.

À professora Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos, co-orientadora, pelo seu exemplo de dedicação.

À colega querida de mestrado Renata, que muito colaborou na realização de meu experimento, sempre prontamente disponível, de bom humor e um sorriso largo no rosto.

Aos colegas do laboratório de pesquisa Silvia, Etiane, José, Helena, Aline, Dievan, Bruna, Cris, Tiago e Guilherme, muito importantes em todas as etapas do meu trabalho, pelo convívio amigo e disponibilidade de doarem seu sangue para o experimento – literalmente falando!

Aos professores Dr. Jarbas Rodrigues de Oliveira, Dr^a. Maria Beatriz Moretto e Dr^a. Sandra Trevisan Beck, por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

Ao diretor do LAC-HUSM, Elehú Oliveira, pelo apoio durante este período.

À minha querida amiga e colega de longos anos de LAC Norma, obrigada pela grande amizade, carinho, compreensão e incansável companheirismo. Um grande suporte durante minhas pesquisas. Não tenho como agradecer tanta amizade!

Às minhas queridas colegas do LAC-HUSM Renata, Nélia, Luciana, Tatiana, Mara, Dirce, Vera, Sandra, Clarice e à minha colega e querida irmã Beth com quem tanto desabafei em meus dias tensos. Obrigada pelo incentivo, compreensão e companhia. Vocês fazem muita falta na minha vida!

A todos os amigos e colegas que não foram citados, mas que, de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

***“Quando os homens
compreenderem
a justiça e praticarem
a lei de Deus,
todos os povos
serão irmãos.”***

Um mentor espiritual

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DA LIGAÇÃO DA ALBUMINA HUMANA AO NÍQUEL E SUA POTENCIAL APLICAÇÃO NA DETECÇÃO DA ISQUEMIA CARDÍACA

AUTORA: SANDRA HUBER DASILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

CO-ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 16 de julho de 2010

A síndrome coronariana aguda (SCA) caracteriza-se pela ocorrência de um conjunto de sinais e sintomas que estão relacionados à isquemia miocárdica. A angina instável (AI) e o infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (IAM-SST) e sem elevação do segmento ST (IAM-SSST) compõem esta síndrome. Destaca-se dentre as doenças que acometem o sistema cardiovascular devido a sua alta prevalência e seu impacto sobre a mortalidade na população em geral. Sua formação ocorre devido à ruptura ou erosão da placa aterosclerótica, produzindo isquemia progressiva tecidual, sendo que esta isquemia pode progredir para necrose dos cardiomiócitos, podendo as alterações serem detectadas por biomarcadores laboratoriais. Os biomarcadores padrão-ouro para o diagnóstico de necrose miocárdica são as troponinas cardíacas I (cTnI) ou T (cTnT), que tem quase absolutas especificidade miocárdica e sensibilidade clínica, refletindo zonas microscópicas de necrose miocárdica. No entanto, marcadores utilizados para detecção da isquemia miocárdica na fase pré-infarto são potencialmente os mais interessantes, pois oferecem a oportunidade de intervenção precoce para impedir a progressão do infarto. Desta forma, um biomarcador que realmente detecte isquemia miocárdica na ausência de necrose acrescentaria substancialmente às atuais ferramentas clínicas. Os objetivos principais deste estudo foram: (a) avaliar a ligação da albumina ao níquel em pacientes com suspeita de SCA e desenvolver um método laboratorial baseado nesta propriedade capaz de detectar a isquemia cardíaca; (b) desenvolver um protocolo do teste de ligação da albumina ao níquel adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira; (c) investigar as características diagnósticas deste método no diagnóstico da SCA; (d) comparar os resultados obtidos no teste de ligação da albumina ao níquel com o teste de ligação da albumina ao cobalto a fim de investigar se o tipo de metal utilizado no ensaio interfere nas características diagnósticas do método. Os pacientes com isquemia do miocárdio apresentaram uma redução na capacidade de ligação da albumina ao níquel, sendo desenvolvido um teste capaz de detectar essa alteração, o qual foi adaptado para o sistema automatizado Cobas Mira. O teste de ligação da albumina ao níquel apresentou um potencial papel na exclusão diagnóstica do IAM e foi eficaz no diagnóstico da SCA em virtude de seus significativos valores preditivos negativo e positivo, respectivamente. O ensaio utilizando o níquel demonstrou uma habilidade discretamente superior no diagnóstico da SCA, do que o ensaio que utiliza o cobalto, o que permite concluir que o tipo de metal (níquel ou cobalto) influencia nas características diagnósticas do ensaio.

Palavras-chave: Síndrome coronariana aguda; isquemia; albumina; cobalto; níquel; albumina modificada pela isquemia.

ABSTRACT

Master Dissertation
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

EVALUATION OF A NICKEL-ALBUMIN BINDING AND ITS POTENTIAL APPLICATION ON THE DETECTION OF CARDIAC ISCHEMIA

AUTHORA: SANDRA HUBER DA SILVA

ADVISOR: PROF. DR. RAFAEL NOAL MORESCO

CO-ADVISOR: PROF^a. DR^a. MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Date and Place: July 16th, 2010, Santa Maria

Acute coronary syndrome (ACS) is characterized by the occurrence of a set of signs and symptoms that are related to myocardial ischemia. Unstable angina (UA) and acute myocardial infarction with ST segment elevation (AMI-SST) and without ST segment elevation (AMI-SSST) comprise this syndrome. It stands out among the diseases that affect the cardiovascular system due to its high prevalence and its impact on mortality in the general population. Its formation occurs due to rupture or erosion of atheromatous plaque, producing progressive tissue ischemia. This ischemia may progress to necrosis of the cardiomyocytes and changes could be detected by laboratory biomarkers. The gold standard biomarkers for the diagnosis of myocardial necrosis are the cardiac troponins I (cTnI) or T (cTnT), which have nearly absolute myocardial specificity and clinical sensitivity, reflecting microscopic areas of myocardial necrosis. However, markers used for the detection of myocardial ischemia during the pre-infarction are potentially the most interesting because they offer the opportunity for early intervention to prevent progression of the infarction. Thus, a biomarker to detect myocardial ischemia in the absence of necrosis would add substantially to the current clinical tools. The main objectives of this study were: (a) to evaluate the binding of albumin to nickel in patients with suspected ACS and develop a laboratory method based on this property capable of detecting cardiac ischemia, (b) develop a test protocol on the binding of albumin to nickel adapted to the automated Cobas Mira, (c) to investigate the diagnostic features of this method in the diagnosis of ACS, and (d) compare the test results of albumin binding to nickel with the albumin cobalt-binding to investigate whether the type of metal used in the test interferes with the diagnostic features of the method. Patients with myocardial ischemia showed a reduction in the capacity of binding albumin to nickel. A test, which was adapted for the automated Cobas Mira, was developed to detect this change. The binding test of albumin to nickel showed a potential role in excluding the diagnosis of AMI and was effective in the diagnosis of ACS because of its significant negative and positive predictive values, respectively. The test using nickel showed a slightly higher skill in the diagnosis of ACS than the test using cobalt. Thus, we could conclude that the type of metal (nickel or cobalt) influences the characteristics of the diagnostic test.

Key words: Acute coronary syndrome; ischemia; albumin; cobalt; nickel; ischemia-modified albumin.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Estrutura tridimensional da molécula de albumina.....	35
FIGURA 2 – Estrutura proposta para a ligação dos metais níquel e cobre no N-terminal da albumina.....	41

MANUSCRITO I

FIGURE 1 - Significant correlations between NABA and CABA for (A) nonischemic chest pain group ($r=0.5776$, $P<0.001$), and (B) myocardial infarction group ($r=0.3991$, $P<0.05$). Results are expressed as absorbance units. NABA: Nickel-albumin binding assay; CABA: Cobalt-albumin binding assay.....	62
FIGURE 2 - ROC curves of CABA and NABA for assessment of myocardial infarction. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.6582 (95% CI, 0.5444 to 0.7720, $P<0.05$), and 0.7800 (95% CI, 0.6785 to 0.8816, $P<0.001$), respectively. NABA: Nickel-albumin binding assay; CABA: Cobalt-albumin binding assay.....	63

MANUSCRITO II

FIGURE 1 - ROC curves of CABA and NABA for assessment of ACS. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.7289 (95% CI, 0.6113 to 0.8466, $P<0.001$) and 0.7582 (95% CI, 0.6543 to 0.8622, $P<0.001$), respectively. ACS: Acute coronary syndrome; CABA: Cobalt-albumin binding assay; NABA: Nickel-albumin binding assay.....	76
---	----

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO I

TABLE 1 – Baseline characteristics of study patients.....	61
---	----

MANUSCRITO II

TABLE 1 – Baseline characteristics of study patients.....	75
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

- ABSU – *Absorbance units* (Unidades de absorvância)
- ACB – *Albumin-cobalt binding* (Teste de ligação da albumina ao cobalto)
- ACS – *Acute coronary syndrome* (Síndrome coronariana aguda)
- AI – Angina instável
- AMI – *Acute myocardial infarction* (Infarto agudo do miocárdio)
- BNP – *B-type natriuretic peptide* (Peptídeo natriurético tipo B)
- CABA – *Cobalt-albumin binding assay* (Teste de ligação da albumina ao cobalto)
- CHO – *Choline* (Colina)
- Cis34 – Resíduo de cisteína na posição 34
- CK – *Creatine kinase* (Creatinoquinase total)
- CK-MB – *Creatine kinase isoenzyme MB* (Creatinoquinase isoenzima MB)
- CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
- cTnI – *Cardiac troponin I* (Troponina cardíaca I)
- cTnT – *Cardiac troponin T* (Troponina cardíaca T)
- DTT – *Dithiothreitol* (Ditiotreitól)
- ECG – Eletrocardiograma
- ED – *Emergency department* (Departamento de emergência)
- ER – *Emergency room* (Sala de emergência)
- ERN – Espécies reativas de nitrogênio
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- FFA – *Free fatty acids* (Ácidos graxos livres)
- FFAu – *Free fatty acids unbound* (Ácidos graxos livres - forma solúvel)
- HSA – *Human serum albumin* (Albumina sérica humana)
- IAM – Infarto agudo do miocárdio
- IAM-SSST – Infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST
- IAM-SST – Infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST
- ICAM-1 – *Intercellular adhesion molecule-1* (Molécula de adesão intercelular-1)
- IGF-1 – *Insulin-like growth factor* (Fator de crescimento similar à insulina)
- IL-6 – *Interleukin-6* (Interleucina-6)
- IMA – *Ischemia-modified albumin* (Albumina modificada pela isquemia)

MI – *Myocardial infarction* (Infarto do miocárdio)

MMP – *Matrix metalloproteinase* (Metaloproteinase da matriz)

MPO – *Myeloperoxidase* (Mieloperoxidase)

NABA – *Nickel-albumin binding assay* (Teste de ligação da albumina ao níquel)

NICP – *Nonischemic chest pain* (Dor torácica não isquêmica)

NO – *Nitric oxide* (Óxido nítrico)

NPV – *Negative predictive value* (Valor preditivo negativo)

NSTEMI – *Non-ST segment elevation myocardial infarction* (Infarto agudo do miocárdio sem elevação do segmento ST)

N-terminal – Grupo amino terminal

NT-proBNP – *N-terminal pro-B-type natriuretic peptide* (N-terminal pró-peptídeo natriurético tipo B)

PAPP-A – *Pregnancy-associated plasma protein A* (Proteína plasmática A associada à gestação)

PCHO – *Plasma choline* (Colina plasmática)

PCR – Proteína C-reativa

PIGF – *Placental growth factor* (Fator de crescimento placentário)

PLD – *Phospholipase D* (Fosfolipase D)

PPV – *Positive predictive value* (Valor preditivo positivo)

ROS – *Reactive oxygen species* (Espécies reativas de oxigênio)

ROC – *Receiver operator characteristic*

SCA – Síndrome coronariana aguda

sCD40L – *Soluble CD40 ligand* (Ligante solúvel do CD40)

STEMI – *ST segment elevation myocardial infarction* (Infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST)

TNF- α – *Tumor necrosis factor- α* (Fator de necrose tumoral- α)

UA – *Unstable angina* (Angina instável)

VCAM-1 – *Vascular cell adhesion molecule-1* (Molécula de adesão de células vasculares-1)

VPN – Valor preditivo negativo

VPP – Valor preditivo positivo

WBCHO – *Whole blood choline* (Colina do sangue total)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Síndrome coronariana aguda	18
2.2 Marcadores bioquímicos na avaliação da SCA	20
2.2.1 Biomarcadores de necrose.....	20
2.2.1.1 Mioglobina.....	20
2.2.1.2 Creatinoquinase isoenzima MB.....	21
2.2.1.3 Troponinas cardíacas T e I.....	22
2.2.2 Biomarcadores de inflamação e desestabilização da placa.....	23
2.2.2.1 Proteína C-reativa.....	24
2.2.2.2 Interleucina-6.....	24
2.2.2.3 Mieloperoxidase.....	25
2.2.2.4 Metaloproteinases da matriz.....	25
2.2.2.5 Ligante solúvel do CD40.....	26
2.2.2.6 Proteína plasmática A associada à gestação.....	27
2.2.2.7 Fator de crescimento placentário.....	28
2.2.2.8 Fator de necrose tumoral-alfa.....	28
2.2.2.9 Moléculas de adesão.....	29
2.2.2.10 D-Dímero.....	30
2.2.3 Biomarcadores de isquemia.....	30
2.2.3.1 Ácidos graxos livres.....	30
2.2.3.2 Colina.....	31
2.2.3.3 Albumina modificada pela isquemia.....	32
2.2.4 Biomarcadores de disfunção cardíaca.....	33
2.2.4.1 Peptídeo natriurético tipo B.....	33
2.3 Albumina humana	33
2.3.1 Fisiologia e estrutura.....	34
2.3.2 Principais propriedades fisiológicas.....	36
2.3.2.1 Vinculação a ligantes.....	36
2.3.2.2 Função antioxidante.....	38
2.3.3 Ligação da albumina a metais.....	40
2.3.4 Redução da capacidade ligante da albumina a metais durante os processos isquêmicos: formação da albumina modificada pela isquemia.....	41
2.3.4.1 IMA na isquemia do miocárdio.....	44

2.3.4.2 IMA em outras condições clínicas.....	47
3 OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo Geral.....	49
3.2 Objetivos Específicos.....	49
4 MANUSCRITOS.....	50
4.1 Manuscrito I.....	50
4.2 Manuscrito II.....	64
5 DISCUSSÃO.....	77
6 CONCLUSÕES.....	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO A – Separata do artigo publicado no periódico Biomarkers.....	94
ANEXO B – Comprovante de submissão do Manuscrito II para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.....	100

1 INTRODUÇÃO

A síndrome coronariana aguda (SCA) destaca-se dentre as doenças que acometem o sistema cardiovascular devido a sua alta prevalência e seu impacto sobre a mortalidade na população em geral. No Brasil, foi responsável por 90.644 óbitos no ano de 2006, sendo que o Rio Grande do Sul é o estado da federação que possui o maior índice de mortalidade específica por doenças isquêmicas cardíacas, perfazendo 70,2 óbitos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). No mundo, a doença isquêmica cardíaca é a principal causa de mortalidade, perfazendo um total de 7,2 milhões de óbitos a cada ano (LOPEZ e MATHERS, 2006). O infarto agudo do miocárdio (IAM) é sua forma mais grave de apresentação. Desde o final dos anos 60 tem sido demonstrado que entre 40 e 65% dos óbitos no IAM ocorrem na primeira hora do início dos sintomas, chegando esse percentual próximo a 80% nas primeiras 24 horas. Com o uso dos agentes fibrinolíticos e dos novos processos de intervenção percutânea, a incidência de óbitos em pacientes com IAM atingiu os atuais 6-10% e, apesar disto, o IAM continua sendo uma das principais causas de mortalidade no mundo ocidental (AVEZUM et al., 2004).

A SCA é caracterizada pela ocorrência de um conjunto de sinais e sintomas que estão relacionados à isquemia miocárdica. A angina instável (AI) e o infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (IAM-SST) e sem elevação do segmento ST (IAM-SSST), quando em conjunto, compõem esta síndrome (ANDERSON et al., 2007; PIEGAS et al., 2009). Sua formação ocorre em decorrência da ruptura ou erosão da placa ateromatosa, produzindo isquemia progressiva tecidual relativa ao tamanho da placa, à anatomia vascular e ao grau de circulação colateral, sendo que esta isquemia pode progredir para necrose dos cardiomiócitos, podendo as alterações ser detectadas por biomarcadores laboratoriais (COLLINSON e GAZE, 2007).

Biomarcadores cardíacos são proteínas componentes das estruturas celulares que são liberados na circulação quando ocorre dano nos cardiomiócitos. Eles exercem um importante papel no diagnóstico, estratificação de risco e no tratamento de pacientes com dor torácica e suspeita de SCA. Várias investigações trouxeram à tona um grande número de novos candidatos a marcadores, mas poucos se integram aos tratamentos clínicos da rotina devido a demora da liberação dos mesmos na circulação ou sua complexidade de análise (SINGH et al., 2010).

Alguns importantes marcadores bioquímicos são liberados das células cardíacas após a ocorrência da necrose, no momento em que a lesão miocárdica já se encontra instalada. São eles: mioglobina, creatinoquinase fração MB (CK-MB), e as troponinas cardíacas T e I (cTnT e cTnI), mas seu surgimento na circulação sanguínea leva algumas horas. As cTnT e cTnI tornaram-se o padrão-ouro como biomarcadores de necrose miocárdica, mas sua natureza sensível para revelar necrose miocárdica é também encontrada em uma série de outras situações clínicas, como insuficiência renal crônica (COLLINSON e GAZE, 2007). Recentemente novas pesquisas vêm aprimorando os ensaios de troponinas, reduzindo o seu limite e o tempo de detecção na circulação. Denominada de troponina cardíaca ultra-sensível, este marcador detecta dentro de duas horas o IAM e com isso melhora substancialmente seu diagnóstico precoce, particularmente em pacientes com dor torácica recente (REICHLIN et al., 2009).

Por outro lado, os novos biomarcadores que refletem inflamação (como proteína C-reativa, mieloperoxidase, ligante solúvel do CD40, proteína plasmática A associada à gestação, interleucina-6, entre outros), ou ativação da hemostasia após a ruptura da placa (como D-dímero) podem estar elevados antes do início da lesão irreversível, mas muitos destes requerem técnicas de ensaio mais sofisticadas e sua falta de especificidade têm impossibilitado suas inclusões dentro dos testes modelos para avaliação de risco (LIPPI et al., 2006).

Marcadores utilizados com a finalidade de detecção da isquemia miocárdica (como a albumina modificada pela isquemia - IMA, colina e ácidos graxos livres) na fase pré-infarto são potencialmente os mais interessantes, mas também são os mais desafiantes. Os marcadores de isquemia oferecem a oportunidade de intervenção precoce para impedir a progressão do infarto. Os desafios com marcadores de isquemia são a especificidade e o valor de referência utilizado para fins diagnósticos. Dentre esses marcadores, a IMA surge como um promissor instrumento no diagnóstico de distúrbios caracterizados pela isquemia, sendo que a mesma está baseada na diminuição da capacidade de ligação da albumina sérica humana ao metal de transição cobalto (IMMANUEL e SANJAYA, 2006; SINHA et al., 2004; FAGAN et al., 2002).

Considerando a grande prevalência das doenças isquêmicas cardíacas na população mundial, a fisiopatologia da doença, a importância do laboratório clínico no diagnóstico e acompanhamento desses pacientes, a importância de investigar o potencial diagnóstico de novos biomarcadores que consigam detectar precocemente processos isquêmicos e, conseqüentemente, apresentar importante aplicação no diagnóstico da SCA, o

desenvolvimento de um teste baseado na ligação da albumina sérica humana a metais de transição, dentre eles o níquel, pode ser de grande valia e aplicabilidade neste processo. Além disso, é interessante aprofundar as pesquisas sobre a ligação entre a albumina e os metais de transição a fim de demonstrar se o tipo de metal utilizado no ensaio influencia no desempenho diagnóstico do teste.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Síndrome coronariana aguda

A síndrome coronariana aguda (SCA) compreende um termo operacional que define uma gama de sintomas clínicos que são compatíveis com isquemia miocárdica aguda. Destaca-se entre as doenças que acometem o aparelho circulatório devido à sua alta prevalência e seu impacto sobre a mortalidade da população em geral. No Brasil, segundo o Ministério da Saúde, as doenças isquêmicas cardíacas foram responsáveis por 90.644 óbitos no ano de 2006, sendo que o Rio Grande do Sul é o estado da federação que possui a maior taxa de mortalidade específica por doenças isquêmicas do coração, perfazendo 70,2 óbitos por 100.000 habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008). No mundo, a doença isquêmica cardíaca é a principal causa de mortalidade, perfazendo um total de 7,2 milhões de óbitos a cada ano (LOPEZ e MATHERS, 2006). Esta síndrome isquêmica compreende o infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST (IAM-SST), sem elevação do segmento ST (IAM-SSST) e angina instável (AI). Características clínicas relacionadas com episódios de dor torácica ou dor epigástrica intensa de origem não traumática, com componentes típicos de isquemia miocárdica, como: câimbras, ardor, compressão subesternal, indigestão inexplicada, dor irradiada ao pescoço, mandíbula, ombros, costas, braços, que podem estar associadas com dispnéia, náuseas, vômitos e sudorese ajudam na identificação de pacientes com suspeita de SCA. Tabagismo, hiperlipidemia, hipertensão arterial, diabetes *mellitus*, obesidade e história familiar são fatores de risco predisponentes à SCA, mas são menos importantes do que os sintomas, eletrocardiograma (ECG) e biomarcadores cardíacos (ANDERSON et al., 2007; PIEGAS et al., 2009).

No atendimento de emergência, a realização de um ECG é essencial para a distinção de pacientes com ou sem elevação do segmento ST, pois a prioridade mais urgente consiste em identificar precocemente IAM-SST, uma vez que os pacientes necessitam de terapia de reperfusão imediata (fibrinólise ou intervenção coronariana percutânea) (ANDERSON et al., 2007). No entanto, o ECG por si só muitas vezes é insuficiente para diagnosticar isquemia do miocárdio ou infarto, pois desvios no segmento ST podem ser observados em outras

condições, tais como: pericardite aguda, bloqueio do ramo esquerdo, hipertrofia do ventrículo esquerdo e síndrome de Brugada (THYGESEN et al., 2007).

A definição de IAM passou por uma série de importantes modificações desde a recomendação da Organização Mundial da Saúde, em 1971. De acordo com a IV Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre o tratamento do IAM-SST (2009), uma revisão universal dessa definição foi sugerida em 2007, baseada na detecção das troponinas cardíacas (PIEGAS et al., 2009). Segundo o consenso da *European Society of Cardiology*, do *American College of Cardiology Foundation*, da *American Heart Association*, e da *World Heart Federation* (ESC/ACCF/AHA/WHF, 2007), as troponinas cardíacas I e T (cTnI ou a cTnT) são, atualmente, os biomarcadores padrão-ouro para o diagnóstico de necrose miocárdica, apresentando elevada especificidade tecidual miocárdica e alta sensibilidade clínica, refletindo, portanto, zonas microscópicas de necrose miocárdica. Amostras de sangue para avaliação da cTn devem ser coletadas na primeira avaliação (algumas horas após o início dos sintomas) e de 6 a 9 horas após. Pode ser necessária para um paciente ocasional uma amostra adicional (entre 12 e 24 horas), se as medidas anteriores não forem elevadas e se houver suspeita clínica de IAM (THYGESEN et al., 2007). De acordo com as Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre AI e IAM-SSST (II Edição, 2007), é necessária uma verificação das concentrações (aumento ou queda) de cTn para distinguir níveis de cTn já elevados antes do evento - como nos pacientes com insuficiência renal crônica ou embolia pulmonar - daqueles elevados devido ao IAM. Caso a análise das troponinas ainda não esteja disponível no laboratório, a melhor alternativa é a CK-MB (medida pelo ensaio de massa ao invés da sua atividade). Seu nível de decisão diagnóstica segue os mesmos princípios das troponinas e sua coleta também deve ser realizada nos mesmos parâmetros. A dosagem de CK total não é recomendada para o diagnóstico de IAM, por sua ampla distribuição no músculo esquelético e pela falta de especificidade desta enzima (NICOLAU et al., 2007). Assim, podemos dizer que o atual diagnóstico de IAM é baseado nos sintomas do paciente, alterações no ECG e nos marcadores bioquímicos altamente sensíveis, bem como a informação obtida a partir de várias técnicas de imagem (THYGESEN et al., 2007).

O IAM-SSST e a AI são entidades relacionadas, porém com diferentes graus de intensidade da isquemia. No IAM-SSST, a isquemia é grave e produz lesão miocárdica, com liberação para a corrente sanguínea dos marcadores bioquímicos de necrose miocárdica. Caso não seja demonstrada a elevação dos níveis dos marcadores bioquímicos, será estabelecido o diagnóstico de AI. Também, no IAM-SSST, podem ser observadas alterações persistentes no ECG (infradesnível do segmento ST, inversão da onda T), enquanto que na AI estas

alterações eletrocardiográficas de isquemia podem estar ausentes ou serem transitórias (BASSAND et al., 2007).

Anteriormente, acreditava-se que a questão principal na SCA era o grau de estenose de um angiograma, e que sintomas e sinais de isquemia indicando perfusão diminuída dos tecidos seriam a ferramenta essencial para avaliar a aterosclerose. No entanto, estudos da medicina moderna têm revelado que complicações trombóticas que culminam, por exemplo, em infarto do miocárdio, não necessariamente resultam de uma estenose crítica do vaso sanguíneo, mas sim de um conjunto de fatores que auxiliam na ruptura da placa aterosclerótica. Esta mudança em nossa compreensão da doença reforça a necessidade de novas estratégias de estratificação de risco da população como um todo (PACKARD e LIBBY, 2008). Portanto, a SCA inicia-se, na maioria das vezes, com a ruptura de uma placa aterosclerótica ou com a erosão superficial do endotélio em uma artéria coronária, estimulando a agregação plaquetária. Se o grau de agregação é suficiente para causar oclusão vascular, poderá ocorrer dano nos cardiomiócitos. O trombo, o qual oclui parcial ou totalmente a artéria, causa uma redução da perfusão sanguínea, ocasionando desequilíbrio entre o suprimento e a demanda de oxigênio para os cardiomiócitos, podendo levar à isquemia ou à necrose de uma área do miocárdio (DAVIES et al., 1986).

Após a isquemia, hipóxia e reperfusão miocárdica, espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas e podem gerar produtos da peroxidação lipídica e protéica. A isquemia e reperfusão também causam acidose, rompimento das bombas dos íons sódio e cálcio e liberação de íons ferro e cobre, causando danos nas células cardíacas. Isto demonstra que os danos isquêmicos não são decorrentes unicamente ao processo necrótico, mas de um conjunto de condições bioquímicas resultantes da sequência de fatos ocorridos (BERENSHTEIN et al., 1997; McCORD, 1985; BAR-OR, LAU e WINKLER, 2000).

2.2 Marcadores bioquímicos na avaliação da SCA

2.2.1 Biomarcadores de necrose

2.2.1.1 Mioglobina

A mioglobina é uma proteína globular, com baixo peso molecular (17,8 kDa), a qual possui um grupo prostético heme. É encontrada em todas as fibras musculares estriadas, sendo responsável por cerca de 2% da massa dos músculos esquelético e cardíaco. Seu pequeno peso molecular permite que ela seja liberada rapidamente na corrente sanguínea após lesão do músculo esquelético e necrose cardíaca (SINGH et al., 2010). A mioglobina tipicamente eleva-se de 1 a 3 horas após o início dos sintomas, com seu pico entre 6 e 9 horas e normalização dentro de 12 a 24 horas (PIEGAS et al., 2009).

Durante a década de 1970, foi a primeira proteína não enzimática usada para o diagnóstico de IAM. Pela sua liberação rápida na circulação, sua alta sensibilidade e seu alto valor preditivo negativo (99,9%), a mioglobina é considerada excelente para descartar o diagnóstico de IAM, apesar de sua baixa especificidade, pois é encontrada também nas células das fibras musculares estriadas. Está elevada no quadro de choque grave, trauma no músculo esquelético, estágio final da doença renal, exercício vigoroso, distrofia muscular, entre outras situações (BROGAN Jr et al., 1994). Portanto, a mioglobina pode ser mais útil quando usada em conjunto com outros marcadores cardíacos para a rápida determinação do IAM, especialmente em pacientes com dor torácica atípica ou alterações eletrocardiográficas inespecíficas (SINGH et al., 2010).

2.2.1.2 Creatinoquinase isoenzima MB (CK-MB)

A creatinoquinase total (CK) é uma importante enzima reguladora da produção e da utilização do fosfato de alta energia nos tecidos contráteis. É uma molécula dimérica composta por duas subunidades (M e B), assim formando três isoenzimas nomeadas CK-MM, CK-BB e CK-MB (BRITTON, HERNANDES e ROBERTS, 1980). Sua fração MB tem sido utilizada para o auxílio do diagnóstico do IAM, entretanto pode ser encontrada levemente alterada no sangue de pessoas saudáveis e, em níveis mais elevados, em dano do músculo esquelético (PIEGAS et al., 2009). Por seu peso molecular ser maior do que o da mioglobina, a CK-MB é liberada na a corrente sanguínea mais lentamente após o dano das células cardíacas. No entanto é mais específica que a mioglobina, pois é encontrada em menor proporção nas células musculares esqueléticas do que nas células cardíacas. A CK-MB constitui 1 a 3% do CK total do músculo esquelético, e está presente em menor quantidade no intestino, diafragma, útero e próstata (MORROW et al., 2007). Como elevações de CK-MB

não provindas do miocárdio são sujeitas de ocorrer, um índice relativo pode ser usado, calculando a razão do CK-MB (massa) / CK total x 100 para ajudar na diferenciação de elevações falso-positivas provindas do músculo esquelético (como na distrofia muscular ou na lesão por esmagamento) e da insuficiência renal (SINGH et al., 2010). Mas este índice é útil somente quando ambos os níveis dos testes (CK total e CK-MB) estão aumentados. Uma razão menor que três é consistente com fonte muscular esquelética. Razões maiores que cinco são indicativas de fonte cardíaca. Entre três e cinco, representam uma zona cinza. Assim, nenhum diagnóstico definitivo pode ser estabelecido sem dosagens seriadas para detectar o seu aumento (SINGH et al., 2010).

Anderson et al. sugeriram em suas diretrizes que, quando analisada, a CK-MB deve ser medida por imunoensaio (CK-MB massa) e não por outros métodos (ANDERSON et al., 2007), por possuir maior sensibilidade clínica e especificidade analítica para detecção do IAM. A CK-MB massa eleva-se entre 3-6 horas após o início dos sintomas, com pico entre 16-24 horas, normalizando-se entre 48-72 horas. Apresenta sensibilidade diagnóstica de 50% após três horas do início dos sintomas e de 80% em 6 horas de evolução. É o melhor ensaio para dosagem de CK-MB disponível (PANTEGHINI, 1998). Em virtude desta cinética, o aumento temporal de CK-MB não permite detecção de necrose precocemente (1 – 3 horas) e não suporta a sensibilidade máxima deste marcador até 6 horas ou mais após o aparecimento do IAM (MORROW et al., 2007).

2.2.1.3 Troponinas cardíacas T e I (cTnT e cTnI)

As troponinas constituem um complexo de três proteínas formadas por finos filamentos localizados nas fibras musculares estriadas. São essenciais para a regulação dos processos de contração dos músculos estriado e cardíaco (NICOLAU et al., 2007). Constituem três isoformas tecido-específicas denominadas I, T e C. A troponina C (TnC) está distribuída somente nos músculos de contração lenta e não tem especificidade cardíaca, portanto, não é utilizada em testes diagnósticos de lesão cardíaca (SCHREIER, KEDES e GAHLMANN, 1990). Além disso, os genes que codificam as isoformas cardíaca e esquelética da TnC são idênticos, não existindo nenhuma diferenciação estrutural entre elas. Diferentemente, as isoformas esquelética e cardíaca das TnI e TnT são distintas e

imunoensaios foram concebidos para diferenciá-las sem reações cruzadas (SINGH et al., 2010).

Em 1989 foi descrita uma preliminar avaliação em que os pesquisadores observaram a alta eficácia de cTnT na detecção do IAM (KATUS et al, 1989). Subsequentemente, houve a descrição da avaliação da cTnI, através de enzimoimunoensaio, onde os achados também foram promissores a respeito da maior cardioespecificidade deste marcador em relação aos antigos marcadores usados até então (BODOR et al., 1992). Atualmente, devido sua alta especificidade e sensibilidade para detectar necrose miocárdica, as cTnT e cTnI são consideradas os biomarcadores “padrão-ouro” para o diagnóstico e avaliação de risco em pacientes com SCA (THYGESEN et al., 2007). Além disso, as troponinas têm surgido como um poderoso preditor de mortalidade e eventos isquêmicos recorrentes (O’DONOGHUE e MORROW, 2008).

Após o dano miocárdico, as cTn surgem na corrente sanguínea e persistem aí devido à lenta liberação e degradação do seu conjunto estrutural, uma vez que sua meia-vida é de cerca de duas horas. Seu pico ocorre entre 18 e 24 horas após o início dos sintomas. A prolongada janela durante a qual os níveis de cTn estão elevados aumenta a detecção clínica de eventos cardíacos e, assim, funcionalmente, aumenta sua sensibilidade clínica (BABUIN e JAFFE, 2005; THYGESEN et al., 2007).

Recentemente pesquisadores desenvolveram um teste de cTn mais sensível do que os testes até então utilizados, reduzindo o seu limite e o tempo de detecção na circulação. Este teste, chamado cTn ultra-sensível, pode detectar a lesão cardíaca dentro de duas horas, melhorando substancialmente o diagnóstico precoce do IAM, particularmente em pacientes com dor torácica recente. Um estudo multicêntrico realizado por Reichlin et al. (2009) examinou a performance diagnóstica de quatro ensaios comerciais de cTn ultra-sensíveis comparados com um ensaio padrão. Seus resultados demonstraram uma maior habilidade destes testes, em relação ao teste padrão, no papel de inclusão e de exclusão do IAM. Além disso, a exatidão dos quatro ensaios também foi maior do que a do ensaio padrão, corroborando com a hipótese de que a cTn com sensibilidade aumentada poderia melhorar o diagnóstico precoce de IAM (REICHLIN et al., 2009).

2.2.2 Biomarcadores inflamatórios e de desestabilização da placa

2.2.2.1 Proteína C-reativa (PCR)

A PCR é uma proteína de fase aguda e um marcador inflamatório, sintetizada principalmente nos hepatócitos, possuindo uma meia-vida plasmática em torno de 19 horas. É regulada pela interleucina-6, interleucina-1 e por outras citocinas (DE FERRANTI e RIFAI, 2002). Inicialmente acreditava-se que a PCR seria somente um marcador de inflamação vascular, mas estudos indicam que ela também desempenha um papel ativo na doença aterosclerótica (TRACY, 1998). Através do desenvolvimento de técnicas com sensibilidade aumentada, surgiu o ensaio de PCR ultra-sensível que detecta níveis de PCR muito baixos, demonstrando servir como um forte preditor de eventos cardíacos futuros, mesmo em pacientes com resultados negativos de cTn (DE FERRANTI e RIFAI, 2002; CLEARFIELD, 2005). A inflamação desempenha um importante papel na aterotrombose, acelerando a aterosclerose e precipitando a ruptura da placa (LIBBY, 2002). Vários estudos clínicos prospectivos demonstraram que a PCR está associada ao risco de mortalidade a curto e longo prazo não só em pacientes com doença isquêmica cardíaca aguda e crônica, mas também para aqueles com risco de aterosclerose (SCIRICA et al., 2007). As estimativas de que mais de 30% dos pacientes com AI grave não apresentam níveis elevados de PCR ultra-sensível, juntamente com a sua natureza inespecífica, representam uma limitação ao seu uso (SINGH et al., 2010).

2.2.2.2 Interleucina-6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina e um mediador intracelular. É produzida por uma variedade de células do organismo e sua concentração plasmática reflete tanto a intensidade da vulnerabilidade da placa ateromatosa quanto sua ruptura. Está envolvida na patogênese da SCA e demonstra os seguintes efeitos: estimulação da produção linear de fibrinogênio e PCR, estimulação dos macrófagos para produzir fator tecidual e MMP, agregação plaquetária, estímulo de moléculas de adesão, fator de necrose tumoral e proliferação das células musculares lisas vasculares (FUTTERMAN e LEMBERG, 2002). A IL-6 prevê futuros IAM em homens saudáveis bem como a mortalidade total em pacientes idosos. Estas medidas podem ser de grande utilidade para identificação de subgrupos de alto risco e, com isto,

intervenções anti-inflamatórias (HARRIS et al., 1999). Elevações de IL-6 na circulação constituem um forte e independente marcador do aumento da mortalidade em eventos agudos coronarianos (LINDMARK et al., 2001).

2.2.2.3 Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma hemoproteína secretada na circulação pelos granulócitos neutrófilos ativados, que possui poderosas propriedades pró-oxidativas e pró-inflamatórias, além de desempenhar um papel importante na patogênese da desestabilização da doença arterial coronariana. Tem sido implicada como participante na aterosclerose através de mecanismos relacionados a seu papel na inflamação, oxidação do LDL e no consumo de óxido nítrico derivado do endotélio, reduzindo a sua biodisponibilidade e prejudicando suas propriedades vasodilatadoras e antiinflamatórias (ZHANG et al., 2001). Assim, a MPO desempenha um papel na degradação da capa fibrosa da placa tornando-se, além de um marcador de inflamação (por ativação dos neutrófilos), também um marcador de instabilidade da placa (que precede a SCA) (SINGH et al., 2010).

Pesquisas demonstram seu papel na estratificação de risco, onde níveis de MPO na apresentação podem predizer com sucesso o risco dos principais eventos adversos cardíacos (como IAM ou morte) no prazo entre 30 dias e 6 meses após, mesmo para pacientes com resultados negativos para cTnT (BALDUS et al., 2003). Mesmo assim são necessários estudos adicionais sobre a sua validação, determinando sua sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo para ser usada como diagnóstico nos pacientes que se apresentam nos serviços de emergência com dor torácica sugestiva de SCA (SINGH et al., 2010).

2.2.2.4 Metaloproteinases da matriz (MMP)

MMP são endoproteases zinco-dependentes com atividade collagenase e/ou gelatinase que estão envolvidas na patogênese de um amplo espectro de desordens cardiovasculares (ARMSTRONG, MORROW e SABATINE, 2006). São sub-agrupadas, com base na

especificidade do substrato e na sua estrutura, em: MMP-1 (colagenases), MMP-2 e MMP-9 (gelatinases) (CREEMERS et al. 2001).

A placa ateromatosa, vulnerável à ruptura, demonstra intensa inflamação com infiltração de macrófagos, linfócitos e mastócitos. Neste meio inflamatório, os macrófagos secretam MMP que progressivamente degradam os componentes colagenosos da cápsula fibrosa. A degradação das fibras de colágeno compromete a estabilidade da placa e a integridade da membrana basal do endotélio, predispondo à ruptura de ateromas avançados. (LIBBY, 2002).

Em pacientes com SCA os níveis de MMP-2 e MMP-9, na admissão hospitalar, apresentam-se duas a três vezes mais elevadas quando comparados a pacientes com angina estável (SINGH et al., 2010). Estudos indicaram que MMP-9 é outro fator de risco para avaliar a severidade da doença arterial coronariana em pacientes com IAM-SST (SQUIRE et al., 2004). Entretanto, existem poucos dados sobre a associação entre níveis de MMP e desfechos cardiovasculares. A lenta elevação dos níveis de MMP após SCA e a falta de resultados clínicos atualmente não fazem dela um biomarcador útil para decisão terapêutica ou estratificação de risco. No entanto estas endoproteases continuam sendo motivo de contínuas investigações para que, futuramente, possam constituir ferramentas de maior utilidade na detecção de SCA. (CELIK et al., 2009).

2.2.2.5 Ligante solúvel do CD40 (sCD40L)

O sistema CD40 é expresso em uma ampla variedade de tipos celulares da placa ateromatosa, incluindo plaquetas ativadas, células endoteliais vasculares, células musculares lisas vasculares, monócitos e macrófagos. Após sua expressão na superfície celular devido ao meio inflamatório dos vasos, o ligante do CD40 (CD40L) é parcialmente clivado por proteases e é liberado na circulação como ligante solúvel do CD40 (sCD40L), que pode ser detectado no soro e plasma. A principal fonte de sCD40L na circulação são as plaquetas (HENN et al., 2001). Pacientes com AI apresentam maiores concentrações de sCD40L do que pacientes com angina estável ou voluntários saudáveis, possivelmente como resultado da liberação das plaquetas ativadas. Uma maior expressão plaquetária de CD40L foi demonstrada em pacientes com SCA. Um estudo realizado demonstrou que um aumento de sCD40L prediz um maior risco de eventos cardiovasculares em mulheres aparentemente

saudáveis (SCHÖNBECK et al., 2001). Uma vez expresso, o CD40L pode manter os efeitos inflamatórios através da promoção de agregados plaquetas-monócitos e produção de ERO (ARMSTRONG, MORROW e SABATINE, 2006).

Em um estudo prospectivo foi detectado que pacientes com dor torácica, posteriormente diagnosticados com SCA e com elevados valores de sCD40L, apresentavam maior risco de eventos cardíacos adversos em relação a pacientes com SCA sem elevações nos níveis de sCD40L (HEESCHEN et al., 2003). Apple et al. (2005) demonstraram que concentrações de sCD40L podem identificar pacientes com risco aumentado de trombose, podendo também ser um útil identificador da instabilidade da placa na SCA em adição aos marcadores de isquemia cardíaca (APPLE et al., 2005). Entretanto, mais pesquisas envolvendo um maior número de pacientes são necessárias para validar o uso clínico do sCD40L, sozinho ou combinado com outros biomarcadores, na predição de eventos cardiovasculares após a SCA (SINGH et al., 2010).

2.2.2.6 Proteína plasmática A associada à gestação (PAPP-A)

A PAPP-A foi originalmente descrita como um peptídeo especificamente elevado em gestantes, sendo frequentemente usada como uma ferramenta de triagem para anormalidades cromossômicas no primeiro trimestre da gravidez. Encontra-se em outros tecidos além do placentário, como nos fibroblastos, células musculares lisas vasculares e em tecidos reprodutivos masculino e feminino, entre outros. É uma metaloproteinase de alto peso molecular vinculada ao zinco e uma molécula potencialmente pró-aterosclerótica que ativa indiretamente o fator de crescimento similar à insulina (IGF-1), um mediador para a aterosclerose (LAWRENCE et al., 1999; BAYES-GENIS et al., 2001).

A PAPP-A é histologicamente abundante em placas com erosão e com ruptura, mas não é expressa em placas estáveis. Seus níveis estão elevados na SCA, podendo refletir a instabilidade da placa aterosclerótica. A correlação entre PAPP-A, cTnI e CK-MB parece ser fraca, indicando que um aumento na PAPP-A não deve ser atribuída à necrose miocárdica (BAYES-GENIS et al., 2001). Também foi demonstrado que uma elevação em seus níveis pode prever eventos cardíacos isquêmicos, bem como a necessidade de intervenção percutânea coronariana ou revascularização cirúrgica do miocárdio com enxerto (LUND et al., 2003). Esta capacidade de detecção precoce do risco faz da PAPP-A um promissor

biomarcador, com potencial aplicação no risco de doença arterial coronariana (SINGH et al., 2010).

2.2.2.7 Fator de crescimento placentário (PIGF)

O PIGF é um membro da família dos fatores de crescimento do endotélio vascular. Ele recruta macrófagos para a lesão aterosclerótica, regula a produção do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e da proteína quimiotática de monócitos-1 (MCP-1) pelos macrófagos, e estimula a angiogênese patológica (SINGH et al., 2010). É um heterodímero constituído de 149 aminoácidos e possui alta homologia com o fator de crescimento vascular endotelial. Vários tecidos expressam PIGF mRNA, incluindo o tecido tireoideano, placentário e pulmonar. Sua função biológica não está totalmente compreendida, mas demonstra estar envolvido no início do processo inflamatório (APPLE et al., 2005).

Heeschen et al. (2004) demonstraram que níveis elevados de PIGF não somente identificam pacientes com dor torácica que desenvolveram SCA, mas também aqueles pacientes com um risco aumentado de instabilidade recorrente após a alta hospitalar. Além disso, uma única medida inicial de PIGF parece melhorar a informação preditiva e prognóstica adquirida com os tradicionais marcadores inflamatórios. Assim, o PIGF demonstra ser um iniciador do processo inflamatório e um promissor biomarcador na formação e ruptura da placa (HEESCHEN et al., 2004). Além de ser um útil preditor de reações adversas em pacientes com SCA a curto prazo, também parece ser um forte preditor a longo prazo destas mesmas reações (LENDERINK et al., 2006). Apesar disto, sua importância ainda precisa ser comprovada em estudos mais extensos (SINGH et al., 2010).

2.2.2.8 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α)

O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) pertence à superfamília dos fatores de necrose tumoral. Estas citocinas estão envolvidas em várias respostas biológicas, tais como a inflamação, a resposta imune e a reparação de tecidos. O TNF- α interage com receptores de células endoteliais vasculares, o que leva a um aumento na permeabilidade vascular. Ele é

secretado por macrófagos, linfócitos e monócitos, sendo seu principal efeito fisiológico promover a resposta imune e inflamatória. Após sua expressão, o TNF- α irá ligar-se a receptores específicos de transmembrana, muitos dos quais são do tipo I e III e, assim, diferentes cascatas de sinalização são ativadas, o que estimula múltiplas respostas biológicas (MARTÍN-VENTURA et al., 2009). Ele está associado à placa aterosclerótica, com deposição e ativação de elementos celulares na parede dos vasos e, possivelmente, à progressão da aterosclerose. O TNF- α também é expresso em resposta à isquemia transitória do miocárdio e à reperfusão (RIDKER et al., 2000). Está presente no sangue de pacientes com doença isquêmica cardíaca crônica e na SCA. Em pacientes com IAM-SST, os níveis de TNF- α são significativamente mais elevados 48 horas após o início dos sintomas, em conjunto com altas concentrações de PCR na admissão, sendo assim um preditor independente de eventos cardiovasculares (GONZÁLVEZ et al., 2007).

2.2.2.9 Moléculas de adesão

As células endoteliais, em contato com o fluxo sanguíneo, normalmente resistem à adesão de leucócitos. Por estímulos pró-inflamatórios, que incluem uma dieta rica em ácidos graxos saturados, hipercolesterolemia, obesidade, hiperglicemia, resistência à insulina, hipertensão e tabagismo, desencadeia-se a expressão endotelial de várias moléculas de adesão. No contexto de recrutamento dos leucócitos, a molécula de adesão de células vasculares-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular (ICAM-1) e a E-selectina parecem ter um papel importante na aderência dos leucócitos presentes no ateroma nascente. Com a adesão dos leucócitos à camada endotelial ativada, ocorre a transmigração dos mesmos, por diapedese, entre as células intactas, iniciando-se o processo aterosclerótico (LIBBY, 2002; TURHAN et al., 2005). Moléculas solúveis de adesão são detectáveis em níveis baixos no soro de indivíduos saudáveis, mas estão aumentadas em pacientes com doenças de etiologia inflamatória ou vascular. Formas solúveis destas moléculas são consideradas marcadores celulares das suas expressões (TURHAN et al., 2005). Vários estudos têm demonstrado a expressão destas moléculas na superfície do endotélio onde ocorrem as placas fibrosas contendo lipídeos. Esta expressão aumenta vastamente após a injúria vascular. Dados destes estudos sugerem que as moléculas de adesão são fundamentais para o recrutamento dos monócitos e, portanto, para o início e progressão da doença aterosclerótica (HUO e LEY, 2001).

2.2.2.10 D-Dímero

O D-dímero é um marcador exclusivo de degradação da fibrina e é formado pela ação sequencial de três enzimas: trombina, fator XIIIa e plasmina. Primeiro a trombina cliva o fibrinogênio, produzindo monômeros de fibrina que polimerizam e servem como um modelo para a formação de fator XIIIa e plasmina. Após, a trombina ativa o fator XIII plasmático a ligar-se a polímeros de fibrina para produzir o fator XIIIa. O fator XIIIa cataliza a formação de ligações covalentes entre os domínios D na fibrina polimerizada. A plasmina degrada o retículo de fibrina e libera produtos da degradação da fibrina, expondo o D-dímero. A utilidade clínica da mensuração do D-dímero foi estabelecida em algumas situações clínicas, mais notadamente para exclusão de trombose venosa profunda (ADAM, KEY e GREEMBERG, 2009). Um estudo evidenciou que elevados níveis de D-dímero estão associados a elevações do risco de futuros IAM entre indivíduos saudáveis, sugerindo que a ativação do sistema fibrinolítico pode ocorrer anos antes da oclusão arterial coronariana (RIDKER et al., 1994). Outro estudo indicou o D-dímero como um marcador precoce de diagnóstico na isquemia coronariana em pacientes com dor torácica (BAYES-GENIS et al., 2000). Moresco et al. (2005) avaliaram pacientes com suspeita de dano miocárdico através de dosagens de cTnT e D-dímero. Os níveis de D-dímero apresentaram-se elevados no IAM, porém, não houve correlação de seus níveis com a cTnT, o que indica que não há uma associação direta entre a intensidade da ativação do sistema fibrinolítico e a extensão do dano no miocárdio (MORESCO et al., 2005).

2.2.3 Biomarcadores de isquemia

2.2.3.1 Ácidos graxos livres (FFA)

Em condições aeróbicas, os ácidos graxos livres (FFA) de cadeia longa não esterificada representam a principal fonte metabólica para a contratilidade do miocárdio, respondendo por quase dois terços do ATP gerado, sendo que o metabolismo da glicose gera o outro um terço restante da demanda de oxigênio para o miocárdio (LIEDTKE, 1981). Os

mecanismos de captação dos FFA pelos miócitos não estão totalmente elucidados, mas envolvem difusão ativa e/ou passiva mediada por carreador (VAN DER VUSSE et al., 2002). Durante a hipóxia e isquemia, os FFA não esterificados causam efeitos prejudiciais ao tecido cardíaco e estão associados com um aumento na incidência de arritmia ventricular e morte em pacientes com IAM (AZZAZY, PELSERS e CHRISTENSON, 2006).

A maioria dos ácidos graxos está ligada à albumina, sendo que apenas uma pequena quantidade do total presente na circulação está na forma solúvel livre (FFAu). Com base em achados preliminares, concentrações de FFAu, ao invés de FFA, podem fornecer dados mais seguros na avaliação da fisiopatologia da doença coronariana. Os mecanismos que provocam a elevação dos níveis de FFAu na circulação ainda não estão bem claros, mas acredita-se que suas concentrações resultem do aumento das catecolaminas sanguíneas, que estimulam a liberação de FFA através da lipólise dos adipócitos. Desta forma, ocorrendo isquemia miocárdica, há uma redução da utilização de FFA pelos miócitos (APPLE, et al., 2005). As concentrações de FFAu são determinadas a partir da relação entre FFA sérico e a albumina. Numerosos estudos sugerem que o aumento das concentrações de FFAu podem ser um indicador precoce de isquemia miocárdica (KLEINFELD et al., 1996).

2.2.3.2 Colina (CHO)

A CHO é liberada através da clivagem da membrana fosfolipídica celular pela enzima fosfolipase D (PLD) para gerar colina plasmática (PCHO). A ativação da fosfolipase ocorre na desestabilização da placa aterosclerótica. Danos à membrana isquêmica produzem avaria fosfolipídica, liberação de CHO e a sua absorção pelos eritrócitos através de um transportador de CHO, formando a CHO do sangue total (WBCHO) (DANNE et al., 2003). Muitos estudos suportam o conceito de que a ativação da enzima PLD é um evento crucial em vários processos da desestabilização da placa aterosclerótica, tais como: estimulação dos macrófagos pela LDL oxidada, secreção de MMP levando à erosão da placa, além da estimulação da trombina e do colágeno na ativação plaquetária. Nas formas mais graves e complicadas de isquemia miocárdica com instabilidade elétrica cardíaca e arritmias, a colina é liberada a partir dos tecidos isquêmicos para o plasma, elevando os níveis de PCHO (DANNE et al., 2007).

Uma comparação realizada entre WHCHO e PCHO demonstrou que a WHCHO, quando testada na admissão hospitalar, particularmente em pacientes com cTnI indetectáveis, é um forte e independente preditor de morte cardíaca e parada cardíaca não fatal em pacientes com SCA, diferentemente da PCHO (DANNE et al., 2003). Entretanto eventos como arritmia severa, que frequentemente ocorrem após 24 horas da admissão, WHCHO e PCHO foram igualmente preditivos (APPLE et al., 2005). Adicionalmente, concentrações persistentemente elevadas de WBCHO também podem ocorrer em pacientes com cTn positivas e com uma intervenção coronariana percutânea inicialmente bem sucedida. Esta elevação persistente pode estar associada à oclusão subaguda do *stent* ou morte súbita cardíaca (APPLE et al., 2005). A colina é um novo e promissor biomarcador, mas sua metodologia de dosagem não é adequada para aplicação na rotina clínica (espectrometria de massa). Atualmente este método está sendo desenvolvido para uso em rotina clínica e, quando estes resultados estiverem disponíveis, será possível avaliar, com maiores detalhes, as características diagnósticas deste teste (COLLINSON e GAZE, 2007).

2.2.3.3 Albumina modificada pela isquemia (IMA)

Devido à alteração conformacional em seu N-terminal provocada pela isquemia, a albumina perde sua habilidade de ligar-se a metais de transição como o cobre, níquel e cobalto (SADLER, TUCKER e VILES, 1994; McCORD, 1985). Esta alteração conformacional da albumina ocorre muito rapidamente após a isquemia, com um pico em 6 horas, e permanece assim até 12 horas após o evento isquêmico, permitindo a detecção de uma isquemia antes do desenvolvimento da necrose miocárdica (BAR-OR et al., 2001; CHRISTENSON et al., 2001; IMMANUEL e SANJAYA, 2006). O decréscimo da capacidade de ligação da albumina aos metais de transição pode ser medido através da adição de uma quantidade específica de cobalto ao soro do paciente, seguida por uma medida colorimétrica que determina a quantidade de cobalto livre, sendo detectada indiretamente a albumina modificada pela isquemia (IMA) (BAR-OR, LAU e WINKLER, 2000). Muitas pesquisas foram realizadas até então com alguns resultados promissores que demonstram o papel da IMA como um biomarcador sensível para identificação de SCA (SINHA et al., 2004). No entanto, os níveis de IMA podem aumentar em outras situações não

necessariamente associadas à isquemia cardíaca. Informações adicionais referentes à IMA serão apresentadas em um capítulo a seguir.

2.2.4 Biomarcador de disfunção cardíaca

2.2.4.1 Peptídeo natriurético tipo B (BNP)

O BNP é um neuro-hormônio sintetizado predominantemente no ventrículo miocárdico e é liberado na circulação em resposta à dilatação ventricular e sobrecarga de pressão na parede miocárdica, na ausência de necrose, e precede a angina e alterações no segmento ST (DE LEMOS et al., 2001; DE LEMOS, MCGUIRE e DRAZNER, 2003). O pró-BNP é sintetizado como um pró-hormônio pelos miócitos cardíacos e sofre clivagem enzimática para produzir o N-terminal pró-BNP (NT-proBNP) e BNP (OGAWA et al., 2006).

Há uma forte evidência de que dosagem de BNP/NT-proBNP é um dos melhores preditores de mortalidade (SINGH et al., 2010). Em um estudo, o NT-proBNP foi significativamente mais elevado na fase aguda precoce no grupo com SCA sem elevação do segmento ST do que no grupo com elevação do segmento ST e SCA, apesar de valores de cTnT e CK-MB serem mais baixos neste grupo. Com isso, foi possível concluir que o NT-proBNP é também um sensível marcador de isquemia cardíaca, e que se eleva precocemente se comparado com os marcadores convencionais de dano miocárdico (OGAWA et al., 2006). Altas concentrações de BNP/NT-proBNP estão associadas a um alto risco de morte ou insuficiência cardíaca independentemente de outras variáveis prognósticas (WANG et al., 2004). No entanto, elevações dos peptídeos natriuréticos são apenas indicativos de estresse hemodinâmico e estado de sobrecarga de fluidos, não sendo específicos para doença cardíaca. Seus níveis podem estar elevados na presença de arritmia arterial, embolia pulmonar, insuficiência renal, doenças hepáticas e hipertensão pulmonar. Também se elevam em situações onde há um desencadeamento do sistema renina-angiotensina (SINGH et al., 2010; JANUZZI et al., 2005).

2.3 Albumina humana

2.3.1 Fisiologia e estrutura

A albumina humana é uma proteína globular tridimensional de cadeia simples sintetizada nas células hepáticas por polissomos ligados ao retículo endoplasmático, como pré-pró-albumina, um precursor que possui uma extensão de 24 aminoácidos no N-terminal (MARGARSON e SONI, 1998; UHING, 2004). Subsequentemente, 18 desses aminoácidos são removidos para formar a pró-albumina. A albumina é formada quando os 6 aminoácidos remanescentes são removidos no complexo de Golgi (UHING, 2004).

Em indivíduos saudáveis, cerca de 30-40% da albumina sintetizada é mantida dentro do compartimento plasmático (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005) e, devido à sua contribuição desproporcional ao pool de proteínas plasmáticas (mais de 50% do total das moléculas proteicas são albumina), a albumina é também responsável por aproximadamente 75% da pressão oncótica do plasma. A pressão oncótica torna-se pressão osmótica, pois as cargas negativas que rodeiam as proteínas atraem partículas de cátions, entre elas o sódio, fazendo assim a retenção de água. Além disso, a albumina pode influenciar diretamente a integridade vascular através de sua ligação na matriz intersticial e subendotélio, reduzindo, assim, a permeabilidade destas camadas a grandes moléculas (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005). A albumina não é armazenada no fígado, sendo imediatamente excretada no sistema linfático hepático ou nos sinusóides. Os principais fatores que regulam sua síntese são a pressão osmótica e a osmolaridade do espaço extravascular intra-hepático. Outro fator que regula a sua síntese é a disponibilidade de alguns aminoácidos essenciais e hormônios (UHING, 2004).

Uma vez sintetizada, a albumina é constituída somente de aminoácidos, sem grupos prostéticos, carboidratos e lipídeos covalentemente ligados a ela. Sua estrutura possui 585 aminoácidos e uma massa molecular de cerca de 66,5 kDa, com poucos resíduos de triptofano ou metionina, mas uma quantidade maior de resíduos como a lisina, ácido glutâmico e alanina. O grande número de resíduos ionizados dá à albumina uma carga total grande, normalmente 185 íons por molécula em pH 7,0, o que contribui para sua solubilidade. Seus aminoácidos ácidos superam os básicos, resultando em uma carga altamente negativa (PETERS, 1995).

De acordo com estudos cristalográficos, a albumina demonstra uma cadeia em formato de coração com dimensões de 30X80X80¹⁰Å. Difração do raio-X também demonstrou que a proteína possui três domínios homólogos(I-III), e que cada um destes é

compostos por dois subdomínios (A e B). Os subdomínios A e B possuem, respectivamente, 6 e 4 α -hélices, sendo que cerca de 67% da estrutura terciária da albumina é composta de α -hélices (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002). A molécula de albumina não é estática. Seus subdomínios têm um movimento adicional por meio de voltas flexíveis, proporcionado pelo resíduo de prolina, o que auxilia na acomodação de substâncias ligantes. Possui 35 resíduos de cisteína, sendo que 34 estão envolvidos na formação de pontes de dissulfeto (17 pontes ao todo). Entretanto, ela também contém uma cisteína livre redox ativa (Cis-34), que representa cerca de 80% dos tióis livres (-SH) do plasma. Este tiol da Cis-34 é reativo e capaz de tiolação (albumina-S-R) e nitrosilação (albumina-S-NO), processos estes que contribuem para numerosas funções *in vivo* (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005). A flexibilidade da estrutura da albumina faz com que ela se adapte facilmente a ligantes, e seus três domínios proporcionam uma variedade de sítios de ligação. Ácidos graxos de cadeia longa são ligados em cerca de 6 sítios, os metais de transição cobre e níquel ligam-se ao N-terminal, desde que o terceiro aminoácido seja a histidina. Compostos sulfidrílicos e certos oxidantes ligam-se covalentemente ao tiol da Cis-34 (PETERS, 1995) (Figura 1).

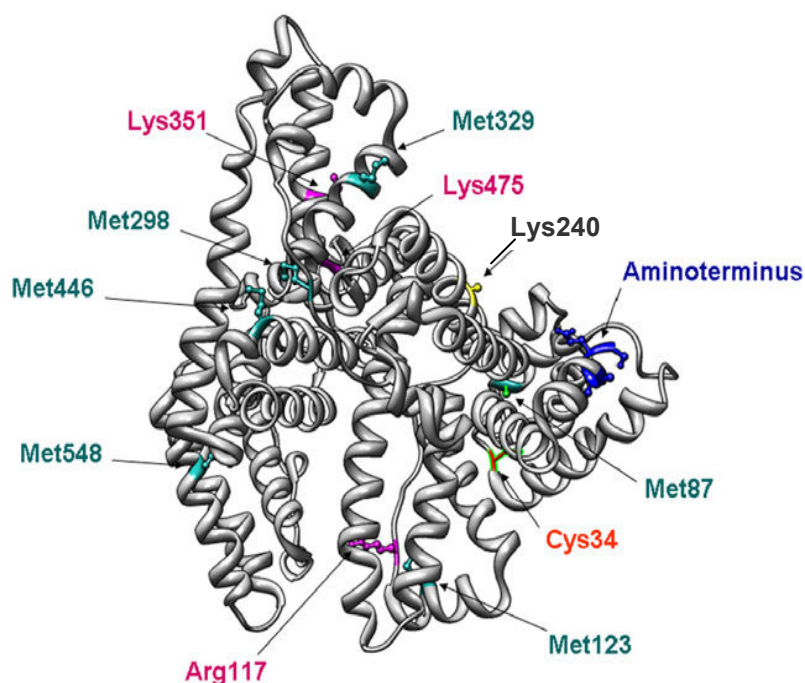


Figura 1 - Estrutura tridimensional da molécula de albumina (Reproduzido de ROCHE et al., 2008).

A albumina é liberada na circulação principalmente na sua forma reduzida, sendo que, em amostras de plasma, a fração principal de albumina denomina-se mercaptoalbumina, que possui tióis reduzidos livres. Foi proposto que na fração não-mercaptoalbumina circulante, o tiol é oxidado a estados de oxidação mais elevados, incluindo a ácidos sulfinico e sulfônico não redutíveis por tiol-reagentes. Este equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida pode ser alterado em estados patológicos, em intensos exercícios físicos e durante o envelhecimento. Por exemplo, um decréscimo na quantidade de tiol por molécula de albumina foi observado em consequência dos danos oxidativos relacionados com a idade (CARBALLAL et al., 2007).

A meia-vida da albumina na circulação é de aproximadamente 16 horas, nas quais circula do espaço intravascular através da parede capilar para o espaço intersticial, e retorna ao espaço intravascular através do sistema linfático (MARGARSON e SONI, 1998). Sua meia-vida total de degradação é de cerca de 20 dias (BALLMER, 2001). A albumina está presente no plasma em concentrações que variam, aproximadamente, entre 3,5 e 5,0 g/dL, sendo altamente estável em amostras de plasma, que podem ser armazenadas por várias semanas à 4°C. Uma diferença discreta nos níveis séricos de albumina é observada entre os sexos, sendo que mulheres possuem 0,2 g/dL a menos do que os homens, diferença que desaparece próximo aos 70 anos de idade. O pico de concentração sérica de albumina (em ambos os sexos) se encontra entre 1-5 anos de idade, com uma média de valores em torno de 4,6 g/dL, decrescendo gradualmente ano a ano até uma média de 3,8 g/dL aos 90 anos (PETERS, 1995).

A hiperalbuminemia é caracterizada pela presença de níveis séricos superiores a 5,5 g/dL, sendo raramente observada na ausência de desidratação. Um elevado nível normal é associado positivamente com o peso e a gordura corporal em homens (mas não em mulheres) (PETERS, 1995). A hipoalbuminemia é a condição encontrada mais comumente, podendo resultar da diminuição na sua síntese (desnutrição, doenças hepáticas), aumento da degradação (hemorragias, síndrome nefrótica, enteropatia perdedora de proteína), ou perdas exudativas (queimaduras, drenos cirúrgicos). O denominador comum de quase todos os estados patológicos é a hipoalbuminemia (BALLMER, 2001; PETERS, 1995).

2.3.2 Principais propriedades fisiológicas

2.3.2.1 Vinculação a ligantes

Dentre as proteínas, a albumina é a mais conhecida pela sua capacidade de vincular-se a vários tipos de moléculas pequenas. A albumina liga-se a muitos compostos endógenos e exógenos como ácidos graxos, íons metálicos, drogas e hormônios. A flexibilidade da estrutura da albumina se adapta prontamente aos ligantes, e seus três domínios fornecem uma variedade de sítios de ligação de baixa e alta afinidade (PETERS, 1995).

Um primeiro estudo revelou que a maioria das drogas liga-se com alta afinidade a dois sítios, chamados I e II, que estão localizados em diferentes domínios. O sítio I provavelmente é extenso, pois ligantes grandes se vinculam a ele, como compostos heterocíclicos e ácidos carboxílicos (furosemida, tenoxicam, fenilbutazona são algumas drogas que se ligam neste sítio). Este sítio é muito adaptável, pois ligantes com estruturas químicas muito diferentes vinculam-se a esta região com alta afinidade. O sítio II, também denominado de sítio indol-benzodiazepínico, parece ser menor ou mais estreito que o sítio I, pois aparentemente não vincula ligantes grandes (como a bilirrubina, hemina, hematina, ou outras porfirinas) a ele. Ligam-se a este sítio drogas como diazepam, ibuprofeno, diclofenaco. Também parece ser menos flexível, pois sua vinculação é mais estereoespecífica. Assim, a vinculação de ligantes no sítio II parece ser mais restrita do que no sítio I (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002). O sítio I localiza-se no domínio II A, e o sítio II localiza-se no domínio III A (PETERS, 1995).

O resíduo de cisteína na posição 34 (Cis34) do subdomínio I A está localizado em uma fenda na superfície da proteína e não participa das pontes de dissulfeto, como mencionado anteriormente. A mercaptoalbumina, que representa a maior fração de tióis livres no sangue e, provavelmente também, parte da não-mercaptoalbumina, são capazes de se ligar ao óxido nítrico (NO) e a íons metálicos como a prata, o mercúrio e o ouro, bem como com a homocisteína e a numerosas drogas (como derivados da bucilamina, auranofina, d-penicilamina, entre outros). A albumina transporta 82% do NO da circulação (PETERS, 1995). A interação covalente entre drogas, tióis e Cis34 da albumina é útil para quantificação de N-acetil-L-cisteína (e L-cisteína) no plasma. Esta interação pode ser quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002).

Ácidos graxos não esterificados se ligam em cerca de seis sítios da albumina. Os três sítios mais fortes ficam em diferentes domínios (PETERS, 1995). Através da estrutura cristalográfica da albumina, foi possível conhecer os múltiplos sítios de ligações de diferentes afinidades para ácidos graxos não esterificados (como o decanoato, dodecanoato, estearato e palmitato). A maioria destes sítios está dentro dos subdomínios, mas alguns sítios são

formados por subdomínios subjacentes. O sítio de maior afinidade a estes ácidos graxos está, provavelmente, dentro do subdomínio III B (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002).

A albumina também transporta hormônios esteróides, embora existam outras proteínas transportadoras mais específicas para o processo. O excesso relativo de albumina compensa a sua baixa afinidade aos hormônios esteróides, fazendo com que a albumina transporte a maior parte deles. A baixa afinidade, na verdade, significa que as moléculas de hormônio transportadas pela albumina são mais rapidamente liberadas para os tecidos (PETERS, 1995). Entre outras substâncias endógenas, o L-triptofano liga-se ao sítio II, e a cisteína na Cis34. A bilirrubina se liga a um dinâmico e flexível subdomínio (II A) (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002). Os sítios de ligação de ácidos biliares não são ainda conhecidos, mas a albumina é responsável pela vinculação de cerca de 80% deles. Estudos aprofundados da interação de íons cálcio à albumina datam de 1934, sendo que cerca de 45% do cálcio da circulação está ligado às proteínas séricas, principalmente à albumina. Em torno de 45% do magnésio circulante também está vinculado à albumina (PETERS, 1995).

Além de substâncias fisiológicas, a albumina pode vincular alguns compostos patológicos, como toxinas urêmicas que se ligam no sítio I, o indol-3-acetato e o hipurato que se ligam ao sítio II (KRAGH-HANSEN, CHUANG e OTAGIRI, 2002). Interessantemente, a albumina tem uma ligação específica para uma proteína denominada G de uma cepa de *Streptococcus*. Seria um mecanismo de “acolhimento de um invasor”, que permite à bactéria escapar do reconhecimento pelo sistema imunitário, facilitando assim sua distribuição por meio da circulação (PETERS, 1995).

2.3.2.2 Função antioxidante

O metabolismo aeróbico é um sistema energeticamente eficiente. Muitos dos intermediários formados nestas reações são potencialmente reativos. As ERO podem causar danos em moléculas (como lipídeos, carboidratos, proteínas, DNA), levando a um acúmulo de produtos finais tóxicos e causando dano ou disfunção celular. O organismo normalmente utiliza sistemas de proteção e reparação que limitam os efeitos causados pelo estresse oxidativo. Um antioxidante, portanto, é definido como qualquer substância que, quando

presente em baixas concentrações, se comparadas com um substrato oxidável, atrasa significativamente ou impede a sua oxidação (HALLIWELL e WHITEMAN, 2004).

Os grupos tióis da cisteína são os alvos preferenciais de espécies reativas na circulação sanguínea. Os tióis podem ser oxidados por um amplo espectro de radicais livres em uma magnitude maior que outros aminoácidos. As proteínas extracelulares dependem de pontes de dissulfeto para sustentar seu correto enovelamento e manter sua estabilidade estrutural. Em contrapartida, as proteínas intracelulares frequentemente contêm cisteína reduzida devido ao meio altamente reduzido em que se encontram. Neste contexto, a albumina possui uma importante função antioxidante no compartimento vascular devido à presença, dentre outros sítios, do seu grupo tiol livre, localizado na Cis34, responsável por cerca de 80% dos tióis reduzidos no plasma humano. Desta maneira, é considerada a principal captadora de diversas ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (CARBALLAL et al., 2007). Para corroborar com as afirmações da capacidade antioxidante da albumina, Radi et al. (1991) demonstraram que o grupo tiol da albumina foi o principal alvo das ERO geradas pela xantina oxidase, tais como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (RADI et al., 1991). Em alguns estudos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o peroxinitrito oxidaram a Cis-34 em um derivado do ácido sulfênico (HSA-SOH), sendo este posteriormente convertido a dissulfeto e transformado em mercaptoalbumina, restaurando a sua função antioxidante (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005).

Durante a inflamação, derivados oxidantes de células inflamatórias contribuem para o estresse oxidativo. A albumina pode, então, reduzir os efeitos inflamatórios através da ação antioxidante. Além disso, ela também pode regulamentar a sinalização celular e mediar forças pró-inflamatórias, através da modificação do equilíbrio redox (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005).

Muitas das atividades antioxidantes da albumina resultam da sua capacidade de vinculação a ligantes. A albumina pode ter uma atividade antioxidante indireta através de sua habilidade a ligar e transportar substâncias com conhecida função antioxidante, como a bilirrubina e o NO (QUINLAN, MARTIN e EVANS, 2005). A bilirrubina ligada à albumina demonstrou ser um potente inibidor da peroxidação lipídica, além de proteger o α -tocoferol de danos mediados pelo radical peróxido (ROCHE et al., 2008).

Entre os ligantes catiônicos, o cobre (Cu-II) e o ferro (Fe-II) merecem particular consideração porque, como metais de transição, eles são muito potentes para gerar ERO, após uma reação com o oxigênio. Estes metais podem interagir com o H_2O_2 , levando à formação de radicais livres hidroxila deletérios através da reação de Fenton. No entanto, ligados a

proteínas, o cobre e o ferro são geralmente menos suscetíveis a participar da reação de Fenton. No plasma, a maior parte do cobre está ligada à ceruloplasmina, mas uma alta porcentagem pode estar ligada à albumina, para impedir reações de geração de ERO. O ferro possui três proteínas envolvidas em seu transporte (transferrina, ceruloplasmina e lactoferrina), No entanto, altas concentrações de albumina na circulação indicam que ela pode ser capaz de eliminar alguns radicais hidroxilas produzidos pelo ferro através de sua reação com H_2O_2 (ROCHE et al., 2008).

2.3.3 Ligação da albumina a metais

Cobre e níquel merecem especial consideração entre os metais, pois a albumina da maioria dos mamíferos liga-se a eles mais fortemente e mais especificamente do que a outros cátions. A albumina possui um sítio específico a estes metais, efetuando o transporte dos mesmos na circulação sanguínea. O local de transporte de metais na albumina é um dos mais extensivamente estudados. Muitas informações das propriedades da ligação do cobre à albumina demonstraram a formação de um complexo do cobre com os quatro nitrogênios do N-terminal da albumina (quadrado-planar) da seguinte maneira: o cobre é mantido firmemente em um anel, sendo envolvido pelo nitrogênio do grupo $\alpha-NH_2$, aos átomos de nitrogênio das duas primeiras ligações peptídicas, e ao terceiro nitrogênio do anel imidazólico da histidina. Há indícios de que o grupo β -carboxil, perpendicular ao plano do anel de nitrogênios do aspartato terminal, participa do processo (figura 2). Foi proposto que a cisteína participa também na vinculação do cobre. O níquel liga-se de maneira similar ao cobre no N-terminal, formando o quadrado-planar, mas cerca de 30% do níquel se liga em uma estrutura octaédrica, que é um pouco menos estável (PETERS, 1995).

Sadler et al. (1994) foram os primeiros a sugerir e demonstrar que o cobalto também se ligaria aos três primeiros aminoácidos do N-terminal da albumina, podendo adotar uma disposição de quadrado planar, mas as coordenações tetraédrica e octaédrica seriam mais comumente encontradas. Ainda nas pesquisas realizadas por Sadler et al. (1994) foi constatado que, em uma albumina normal (intacta), a região N-terminal, que compreende a sequência de aminoácidos aspartato, alanina, histidina e lisina, pode ser um forte sítio ligante a metais de transição, como o cobre, o cobalto e o níquel (SADLER, TUCKER e VILES, 1994). A albumina é um agente de transporte importante para outros metais, onde é possível

A propriedade de ligação da albumina a metais de transição é bem conhecida e relatada por vários autores, mas as alterações nos sítios de ligação a esses metais por eventos isquêmicos não foram ainda amplamente investigadas (BAR-OR, LAU e WINKLER, 2000). Estudos revelam que o sítio de ligação da albumina a metais é particularmente suscetível à degradação bioquímica, se comparado à albumina de outras espécies. O sítio de ligação a metais melhor caracterizado está localizado no N-terminal e tem uma particular alta afinidade aos íons cobre e níquel. Chan et al. (1995) demonstraram, *in vitro*, a degradação do N-terminal (submetido a condições fisiológicas de pH e temperatura), concluindo que este processo pode, portanto, ocorrer *in vivo* (CHAN et al., 1995). Condições que podem alterar o sítio de ligação da albumina a metais provavelmente ocorrem minutos após o início do evento isquêmico. Os mecanismos que envolvem a isquemia e que promovem a alteração da ligação da albumina a metais, devido ao insuficiente suprimento de oxigênio aos tecidos, podem incluir exposição do endotélio, hipóxia, desenvolvimento de acidose, ação de radicais livres, ruptura da bomba voltagem-dependente de cálcio e liberação de íons ferro e cobre (REIMER et al., 1977; McCORD, 1985; BERENSHTEIN et al., 1997).

Outra teoria associada à geração da IMA foi proposta por Gaze et al. (2009). Segundo essa teoria, com a liberação dos íons metálicos durante a hipóxia, provavelmente inicia-se uma potencial via de formação da IMA, onde a isquemia localizada resulta em acidose e liberação de cobre (II) a partir de fracos sítios de ligação nas proteínas circulantes. Na presença de um agente redutor, como o ácido ascórbico, o cobre (II) livre é convertido em cobre (I), que reage com o oxigênio para formar cobre (II) e gerar radicais livres superóxidos. A enzima superóxido dismutase converte os radicais livres a peróxido de hidrogênio, que é então degradado pela catalase. Os íons de cobre (II) livres são imediatamente vinculados pelo N-terminal da albumina. A albumina ligada ao cobre é então danificada pelos radicais livres hidroxila, causando remoção nos três aminoácidos do N-terminal e liberando o íon cobre (II) para então repetir o processo numa reação em cadeia. Este mecanismo postulado, embora teoricamente atraente, não foi comprovado na prática (GAZE, 2009). Em um estudo incluindo pacientes com elevação de IMA, a porção N-terminal da albumina foi sequenciada em 8 casos e não houve provas de degradação ou truncamento do N-terminal. Isto leva a crer que modificações estruturais no N-terminal da albumina ainda não foram bem esclarecidas (BHAGAVAN, et al. 2003).

A proposta de que ERO tais como o superóxido e os radicais hidroxila gerados durante a isquemia/reperfusão modificam o N-terminal da albumina, resultando na formação de IMA, levou Roy et al. (2004) a estudos onde desenvolveram um modelo de formação de IMA *in*

in vitro usando ERO gerados quimicamente e um captador do radical hidroxila (mercaptopropionilglicina). Observou-se como resultado a geração de hidroxila pela reação de Fenton, que foi associada com um aumento rápido nas concentrações de IMA. Esta investigação *in vitro* mostrou, pela primeira vez, que a formação de IMA está diretamente relacionada à geração de ERO. Estes dados suportam a hipótese de que ERO, especificamente o radical estudado hidroxila, podem modificar quimicamente a albumina *in vivo*, resultando na formação de IMA (ROY et al., 2004).

A descoberta de que a albumina sérica de pacientes com isquemia do miocárdio apresenta uma menor capacidade de ligação *in vitro* a metais de transição do que a albumina sérica de indivíduos saudáveis fez com que Bar-Or et al. (1999) desenvolvessem um ensaio colorimétrico baseado na redução da vinculação da albumina ao cobalto durante estes eventos isquêmicos (BAR-OR et al., 1999; BAR-OR, LAU e WINKLER, 2000). O ensaio colorimétrico que se baseia na ligação da albumina humana ao cobalto exógeno é capaz de detectar o processo isquêmico proveniente de um IAM ou de outro distúrbio cardiovascular anteriormente à necrose tissular, sendo assim de estimável valor (FAGAN et al., 2002). Denominado de “Teste de Ligação da Albumina ao Cobalto” (ACB), foi aprovado pela “Food and Drug Administration (FDA)” para ser um marcador a mais na avaliação da isquemia do miocárdio. É o primeiro novo teste sanguíneo para avaliação de ataques cardíacos desde 1994 (FDA, 2003).

Tentando entender o mecanismo de ação da ligação do cobalto à albumina, Bar-Or et al. (2008) ainda descreveram alguns fatores que influenciam a ligação dos metais de transição à albumina durante os processos isquêmicos, como a proporção do N-terminal intacto da albumina, a sua concentração sérica, a razão cisteína/cistina (que diminui no estresse oxidativo fazendo com que diminuam os grupos tióis livres, resultando em maior quantidade de metal não ligado ao grupamento tiol), e o pH do plasma. Ainda na análise cromatográfica descrita pelos mesmos pesquisadores, adicionando-se cobre e cobalto em razões equimolares a um plasma normal em pH fisiológico, concluiu-se que o complexo cobalto-albumina foi menos observado. Isto indica que o cobre tem mais afinidade ao N-terminal do que o cobalto neste pH. A compreensão da contribuição destas variáveis poderia levar ao desenvolvimento de um teste melhor e com maior utilidade clínica (BAR-OR et al., 2008).

Uma correlação inversa e significativa entre concentrações de IMA e albumina foi verificada, sendo sugerido que níveis de IMA em pacientes com concentrações séricas de albumina extremamente baixas ou altas (<2,0 ou >5,5 d/dL) podem não ser confiáveis, e carecem de valor clínico informativo. Valores de albumina fora do intervalo de referência

devem ser interpretados com cautela (GAZE, CROMPTON e COLLINSON, 2006; APPLE et al., 2005). Os resultados das pesquisas realizadas por Lippi et al. (2007) confirmam que níveis de albumina sérica altos (desidratação severa e dieta rica em proteínas) ou baixos (comprometimento na síntese hepática, má absorção, redução de captação protéica, aumento do catabolismo, inflamação ou dano tissular, perdas renais ou intestinais, aumento da permeabilidade capilar) podem afetar os resultados de IMA, produzindo baixos ou altos valores, respectivamente. Para verificar se o ajuste nos valores de IMA de acordo com a concentração sérica de albumina pode reduzir a variabilidade analítica de IMA, Lippi et al. (2007) realizaram as análises de IMA e albumina em 86 pacientes saudáveis, sem sinais ou sintomas de isquemia e concentrações indetectáveis de cTnT. Foi aplicada uma fórmula para a correção dos valores de IMA em relação à concentração sérica de albumina: (concentração de albumina sérica individual/concentração média de albumina da população) x valor de IMA. Com as evidências consolidadas de que a dosagem de IMA é influenciada pela concentração de albumina presente no sangue, a adoção da fórmula de correção pode ser eficaz na superação desta interferência (LIPPI et al., 2007). É estimado que, aproximadamente 1-2% da concentração total de albumina na população normal está na forma de IMA, comparado aos 6-8% dos pacientes com isquemia. A IMA também está elevada em pacientes com cirrose, infecções bacterianas e virais, câncer avançado, isquemia cerebral, insuficiência renal crônica e anemia associada à doença renal crônica (SINGH et al., 2010; CICHOTA et al., 2008). Vários estudos apontam que a IMA tem seus níveis aumentados dentro de minutos após o início da isquemia, permanecendo elevada por 6-12 horas, e retornando ao normal dentro de 24 h (LIPPI et al., 2006; SINHA et al., 2003; WORSTER et al., 2005; CHRISTENSON et al., 2001).

2.3.4.1 IMA na isquemia do miocárdio

Muitos estudos têm avaliado a utilidade clínica da dosagem de IMA em pacientes, tanto os admitidos na emergência hospitalar com dor torácica e suspeita de SCA, como aqueles submetidos à angioplastia coronariana, entre outros procedimentos. Sinha et al. (2004) demonstraram o potencial valor da IMA como biomarcador para o diagnóstico da AI. Um número maior de pacientes foi reconhecidamente diagnosticado com AI pelos resultados elevados de IMA do que por alterações no ECG. A combinação de IMA, ECG e cTnT

possibilitou a exclusão diagnóstica de muitos pacientes com dor torácica não isquêmica que permaneceriam hospitalizados para futuras observações (SINHA et al., 2004). Bar-Or et al. (2001) mensuraram IMA, CK-MB, mioglobina e cTnI antes, imediatamente após, e 6 e 24 horas após a angioplastia coronariana em 41 pacientes. Os resultados do teste de ACB demonstraram uma elevação média percentual significativa de 10,1% logo após a angioplastia se comparados com os resultados de base (antes da angioplastia coronariana). CK-MB, mioglobina e cTnI não elevaram-se significativamente logo após a angiografia, mas elevaram-se 6 e 24 h mais tarde. Este estudo demonstrou que a IMA é um marcador precoce de isquemia do miocárdio, em contraste com a CK-MB, mioglobina e cTnI, que se elevam mais tardiamente após o início da isquemia (BAR-OR et al., 2001).

Uma meta-análise incluindo oito estudos com mais de 1800 pacientes com suspeita de isquemia miocárdica concluiu que a combinação de ECG, troponina e IMA teve 94,4% de sensibilidade e 97,1% de valor preditivo negativo para a exclusão diagnóstica de SCA na emergência hospitalar (PEACOCK et al., 2006). O papel da IMA foi comparado e correlacionado com outros biomarcadores (CK-MB, mioglobina e cTnI) em vários outros estudos, comprovando que o teste de ligação do cobalto à albumina possui 80% de sensibilidade para o diagnóstico de isquemia miocárdica. Quando associada a outros biomarcadores, a sensibilidade de detecção de isquemia elevou-se para 97% (ANWARADDIN et al., 2005). Estes estudos confirmam outras observações que associam o diagnóstico clínico de isquemia miocárdica ou não-isquemia miocárdica com os resultados de IMA (BHAGAVAN et al., 2003).

Hacker et al. (2007) obtiveram uma forte correlação entre concentrações séricas de IMA e processos associados com ruptura aguda da placa ateromatosa. Isto demonstra ser um indício de que IMA pode refletir um processo precedente à isquemia, como a liberação de componentes da placa, iniciando a cascata do estresse oxidativo e, conseqüentemente, modificando a estrutura da albumina (HACKER et al., 2007). Consuegra-Sanchez et al. (2008) realizaram um estudo prospectivo com 207 pacientes atendidos em um serviço de emergência com suspeita de SCA, os quais foram atendidos dentro de 3 h após o início dos sintomas característicos. Coletas de sangue para mensurar IMA foram realizadas na admissão, sendo os pacientes acompanhados 30 dias após (para verificar morte cardíaca, IAM não fatal e angina recorrente) e um ano após (todas as causas de mortalidade). Os resultados obtidos demonstraram que elevados níveis de IMA na apresentação dos pacientes com dor torácica aguda isquêmica foi independentemente associado com desfechos adversos a curto e longo prazo. Destes pacientes com IMA elevada, 53% foram diagnosticados com AI, apoiando o

fato da IMA ser um marcador de isquemia ao invés de necrose. Assim, a IMA também poderia ajudar a identificar pacientes com um mau prognóstico dentre aqueles com suspeita de SCA (CONSUEGRA-SANCHEZ et al., 2008).

Shen et al. (2010) avaliaram concentrações de IMA e cTnI em amostras obtidas de pacientes com sintomas de SCA na emergência hospitalar em diferentes momentos: dentro de 3 h da admissão, 1 dia, 3, 7 e 14 dias após a apresentação. Foram observados níveis aumentados de IMA dentro das 3 h da apresentação, sendo o pico ocorrido em 24 h e mantido com a continuidade da necrose miocárdica e, após, decrescendo gradualmente. Nas suas avaliações, estes pesquisadores sugerem que a duração da elevação da IMA é prolongada em pacientes com SCA e que sua elevação precoce (dentro de 3h) é anterior à elevação de cTnI no mesmo intervalo de tempo, tornando a IMA um marcador para diagnóstico precoce de SCA (SHEN et al., 2010). Roy et al.(2004) estudaram 131 pacientes com sintomas sugestivos de SCA, mas com ECG normal ou não interpretável. Todos os pacientes obtiveram resultados negativos para cTn na admissão da emergência hospitalar. A IMA foi significativamente mais elevada nos pacientes com isquemia miocárdica do que nos pacientes com dor torácica não isquêmica (ROY et al., 2004).

Algumas perguntas permanecem sem resposta em relação à IMA e ao teste de ACB. O teste parece ter limitada especificidade, com muitos falso-positivos. Também parece ter considerável sobreposição entre resultados normais e isquêmicos. Um resultado positivo de ACB não demonstrou diferenciar AI e início de necrose miocárdica, onde os marcadores de necrose ainda não estão aumentados (APPLE et al., 2005). Além disso, algumas pesquisas realizadas não confirmam o valor da IMA como um útil marcador de isquemia (KEATING et al., 2006). Pacientes com IAM-SST após revascularização por intervenção coronariana percutânea foram o alvo do estudo de Hjortshøj et al. (2009). As coletas de sangue para avaliação de IMA foram realizadas antes da revascularização e em vários momentos após, sendo esta dosada em conjunto com alguns biomarcadores cardíacos. A IMA aumentou 16% acima do seu limite normal após a intervenção coronariana percutânea (com um pico em 40 minutos). Concentrações relativas de IMA se apresentaram baixas em relação aos outros biomarcadores. Esta pesquisa demonstrou que uma normalização de IMA dentro de 2,5 horas após este procedimento pode levar a uma estreita janela diagnóstica e diminuir o seu valor preditivo negativo (VPN) em pacientes que demoram a chegar à emergência hospitalar após o evento isquêmico, estando, portanto, com níveis de IMA já normalizados (HJORTSHØJ et al., 2009). Outra pesquisa realizada por Hjortshøj et al. (2010) com 107 pacientes com dor torácica (com coletas de sangue em três momentos diferentes), onde 35 pacientes

apresentaram diagnóstico final de SCA, demonstrou uma sensibilidade de 86%, especificidade de 49% e o VPN de 88% para a IMA. Com isso, os autores indicam que em nenhum momento a IMA oferece sensibilidade e especificidade comparadas a outros biomarcadores cardíacos (HJORTSHØJ, KRISTENSEN e RAVKILDE, 2010).

2.3.4.2 IMA em outras condições clínicas

Vários outros processos isquêmicos onde há alterações vasculares de pH, hipóxia, ou outro mecanismo que desencadeie o estresse oxidativo, levam à formação de IMA. Falkensammer et al. (2007) concluíram que a IMA pode representar um marcador clínico na isquemia do músculo esquelético (FALKENSAMMER et al., 2007). Nos estudos realizados por Zapico-Muñiz et al. (2004), os indivíduos foram submetidos a um teste de isquemia do antebraço (através de exercício do antebraço realizado por um minuto com suprimento de sangue interrompido por compressão externa) e demonstraram que os níveis de IMA apresentaram-se alterados na presença desta isquemia (ZAPICO-MUÑIZ et al., 2004). Cichota et al. (2008) avaliaram os níveis de IMA e lactato em pacientes com anemia associada à doença renal crônica e sua correlação com níveis de hemoglobina. Houve elevação de IMA e lactato durante a anemia e esta elevação poderia estar associada à hipóxia devido aos baixos níveis de hemoglobina encontrados nos pacientes com doença renal crônica (CICHOTA et al., 2008). Polk et al. (2008) utilizaram a IMA como marcador diagnóstico em pacientes com sintomas de isquemia intestinal. Este estudo incluiu pacientes que realizaram laparotomia exploratória com sintomas de isquemia e/ou obstrução intestinal. Os resultados apresentados foram promissores, com um significativo aumento nos níveis de IMA comparados com indivíduos sem isquemia intestinal, sendo obtido uma sensibilidade de 100% e especificidade de 85,7% para os valores de IMA (POLK et al., 2008).

Amirtharaj et al. (2008) demonstraram que o aumento de marcadores de estresse oxidativo como as proteínas carboniladas e o malondialdeído em pacientes com esteatose hepática indicam a presença de peroxidação lipídica e parece estar associado com um decréscimo na capacidade de ligação do cobalto à albumina. O aumento de ácidos graxos ligados à albumina nestes pacientes provavelmente atenua os efeitos dos radicais livres e diminui a ligação do cobalto à albumina (AMIRTHARAJ et al., 2008). Gunduz et al. (2008) analisaram a IMA em doenças cerebrovasculares e também observaram a elevação de seus

níveis, e que sua medida pode ser usada para distinguir hemorragia sub-aracnoídea de infarto cerebral durante a fase aguda do evento cerebrovascular (GUNDUZ et al., 2008). Turedi et al. (2008) investigaram se níveis de IMA são úteis no diagnóstico da embolia pulmonar. Concluíram que IMA é uma boa alternativa ao D-dímero para o diagnóstico em questão em termos de custo e eficiência. Usada em combinação com as probabilidades clínicas, ela apresentou um efeito similar em sensibilidade e em VPN ao D-dímero (TUREDI et al., 2008). Piwowar et al. (2008) avaliaram a IMA em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 2 e observaram níveis elevados de IMA nestes pacientes, confirmando que eram de origem não-cardíaca e sugerindo que a molécula de albumina dos pacientes diabéticos é modificada em condições de hipóxia crônica provocadas principalmente por hiperglicemia e pelo estresse oxidativo associado ao diabetes (PIWOWAR, KNAPIK-KORDECKA e WARWAS, 2008). Outro estudo com pacientes apresentando diabetes *mellitus* tipo 2 realizado por Kaefer et al. (2010) confirmou a elevação dos níveis de IMA nestes pacientes, provavelmente devido aos mecanismos de hipóxia, estresse oxidativo e inflamação provocados principalmente pela hiperglicemia no diabetes. Uma correlação significativa entre IMA e PCR ultra-sensível no diabetes *mellitus* tipo 2 também foi encontrada, concluindo que hiperglicemia e inflamação reduzem a capacidade de ligação da albumina ao cobalto, resultando em níveis elevados de IMA (KAEFER et al. 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a ligação da albumina ao níquel em pacientes com suspeita de síndrome coronariana aguda e desenvolver um método laboratorial baseado nesta propriedade que seja capaz de detectar a isquemia cardíaca.

3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver um protocolo do teste de ligação da albumina ao níquel adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®].
- Investigar a aplicabilidade do teste de ligação da albumina ao níquel na detecção da isquemia do miocárdio e no diagnóstico da síndrome coronariana aguda, bem como as características diagnósticas deste método.
- Comparar os resultados obtidos no teste de ligação da albumina ao níquel com o teste de ligação da albumina ao cobalto a fim de investigar se o tipo de metal utilizado no ensaio interfere nas características diagnósticas do método.

4 MANUSCRITOS

4.1 Manuscrito I

Biomarkers 2010, 15:353-7.

Characteristics of a nickel-albumin binding assay for assessment of myocardial ischemia

Sandra Huber da Silva^{1,2}, Bruna dos Santos Hausen², Dievan Bisognin da Silva², Aline Minuzzi Becker², Marli Matiko Anraku de Campos^{1,2}, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte³, Rafael Noal Moresco^{1,2,*}

¹ Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

² Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

³ Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil

***Corresponding Author:** Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1402, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

ABSTRACT

Background: The aim of this study was to describe a method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel.

Methods: We measured the levels of cardiac troponin I (cTnI), serum albumin, ischemia-modified albumin (IMA) measured by cobalt-albumin binding assay (CABA), and a nickel-albumin binding assay (NABA) in the following groups: myocardial infarction (n=32) and nonischemic chest pain (n=64).

Results: IMA, cTnI and NABA levels were higher in myocardial infarction group. NABA presented higher ability to discriminate myocardial ischemia than CABA.

Conclusions: Patients with myocardial infarction have reduced nickel binding to human serum albumin, and NABA may have an important role as an early marker of myocardial ischemia.

Keywords: Myocardial ischemia, Serum albumin, Nickel, Cobalt, Oxidative stress.

Introduction

Myocardial infarction is defined as myocardial cell death due to prolonged ischemia (The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee, 2000). Although clinical presentation and electrocardiogram (ECG) are critically important for its diagnosis, biochemical markers including myoglobin, creatine kinase-MB, and particularly cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) play a fundamental role in the diagnosis, risk stratification, and therapeutic management of acute coronary syndrome (ACS) patients (Christenson, 1998; Christenson, 2001; Moresco, 2005). Myocardial ischemia results from the lack of adequate blood perfusion to the myocytes leading to a deficiency of oxygen and nutrients, eventually compromising their vital functions.

During ischemia, the generation of reactive oxygen species (ROS) influences the metal binding capacity of albumin for transition metals (Roy, 2006; Cichota, 2008; Duarte, 2009). Recently, a novel biochemical method measuring ischemia-induced alterations of the binding capacity of human serum albumin (HSA) to exogenous cobalt was reported (Bar-Or, 2000). Also, ischemia-modified albumin (IMA) has been shown to be a rapid rising and sensitive biochemical marker especially for the diagnosis of myocardial ischemia (Bar-Or, 2000; Sinha, 2004). IMA is considered a marker of myocardial ischemia in contrast to cardiac enzymes that are released when cardiac necrosis occurs (Sbarouni, 2006). Admission measurement of IMA can be used for early classification of patients presenting to the emergency department (ED) to assist in patient triage (Collinson, 2006) since negative IMA has a high negative predictive value to exclude acute coronary syndromes (Peacock, 2006). However, some authors do not support the use of IMA as an effective risk stratification tool for patients with chest pain in the ED, especially due to its low specificity (Keating, 2006). Thus, considering the importance of biochemical markers of ischemia, the purpose of this study was to describe a method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel, and to evaluate its association with albumin-cobalt binding assay. We investigated the diagnostic characteristics of these assays for the assessment of myocardial ischemia, as well as whether the type of metal (cobalt and nickel) influences the performance of the test.

Methods

Study population

Patients from the Hospital de Caridade, Santa Maria-RS, Brazil were enrolled prospectively in this study. Ninety six chest pain patients were divided into two groups as follows: myocardial infarction (MI) group, 32 patients (mean age \pm SD, 73.4 ± 9.9 years) presenting to the ED and definitively diagnosed with myocardial infarction, and nonischemic chest pain (NICP) group, 64 patients (mean age \pm SD, 64.9 ± 14.5 years). The final diagnosis of myocardial infarction was based on cTnI elevation in conjunction with the ECG and clinical findings according to the criteria of European Society of Cardiology/American College of Cardiology Joint Committee definition (The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee, 2000). Patients were classified as NICP when: (a) a reported noncardiac mechanism was confirmed as the cause of pain; (b) negative cTnI results on serial sampling, and (c) presence of normal ECG. Patients presenting chronic kidney disease were excluded from this study. This study protocol was approved by the local ethics committee (number 0180.0.243.000-08).

Biochemical determinations

All blood samples were collected at the time the patient first presented and within 12 h following the onset of acute symptoms. After obtaining blood samples in Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes without anticoagulants, specimens were routinely centrifuged for 15 minutes at 2500 g within 1 h of collection, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks before IMA measurement. Serum levels of cTnI were measured by use of a chemiluminescence immunoassay on Immulite 2000[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA), and albumin levels were measured by use of bromocresol green method on Cobas Mira[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) analyzer. Serum IMA was measured by a colorimetric cobalt-albumin binding assay (CABA) previously described (Bar-Or, 2000). This method involved adding 50 μL of 0.1% cobalt chloride (Sigma, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in H_2O to 200 μL of serum, gently mixing, and waiting 10 min for adequate cobalt-albumin binding. Fifty microliters of dithiothreitol (DTT) (Sigma, 1.5 mg/mL H_2O) was added as a colorizing agent and the reaction was quenched 2 min later by adding 1.0 mL of NaCl 0.9%. Using a spectrophotometer Hitachi U-2800A[®] (Hitachi High-

Technologies Corporation, Japan) at 470 nm, the color development with DTT was compared to a serum-cobalt blank without DTT and results were reported in absorbance units (ABSU).

A colorimetric method based on nickel-albumin binding was described to measure the ischemia-induced alterations of the binding capacity of human serum albumin to exogenous nickel. This assay was developed based on biochemical properties of albumin to bind transition metals (Bar-Or, 2000; Bar-Or, 2001). Nickel-albumin binding assay (NABA) involved adding 50 μL of 0.1% nickel sulfate (Sigma, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) in H_2O to 100 μL of patient serum, gently mixing, and waiting 10 min at 37°C for adequate nickel-albumin binding. Then, 100 μL of DTT (Sigma, 1.5 mg/mL H_2O) was added as a colorizing agent and the reaction was quenched 2 min later by adding 500 μL of NaCl 0.9%. Using a spectrophotometer Hitachi U-2800A[®] (Hitachi High-Technologies Corporation, Japan) at 470 nm, the color development with DTT was compared to a serum-nickel blank without DTT and results were reported in absorbance units (ABSU). The colorimetric assay format quantitatively measures unbound nickel remaining after nickel-albumin binding has occurred. Thus, with reduced nickel-albumin binding, there is more unbound nickel, resulting in elevated assay levels.

Statistical analysis

Student *t* test was used to evaluate the differences between groups. Pearson correlation was assessed to evaluate the association between NABA and CABA. Receiver operator characteristic (ROC) curve was performed to quantify the overall ability of NABA and CABA to discriminate among those individuals with myocardial ischemia and those without myocardial ischemia. The sensitivity and specificity of these assays were assessed by ROC curve. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

Results

Baseline characteristics of study patients are shown in Table 1. The levels of cTnI were higher in MI group in comparison to NICP group. No significant differences were observed for serum albumin levels between the two groups. The levels of IMA measured by

CABA were higher in patients with MI (0.479 ± 0.197 versus 0.369 ± 0.202 ABSU, $P < 0.05$). We also observed higher levels of NABA in MI group (0.555 ± 0.171 versus 0.384 ± 0.165 ABSU, $P < 0.001$), as shown in Table 1. We used an albumin adjusted correction (Lippi, 2007) to evaluate the influence of albumin levels on CABA and NABA values in study subjects, and differences between groups remained significant after correction, as follows: CABA (MI: 0.430 ± 0.178 ABSU versus NICP: 0.358 ± 0.209 ABSU, $P < 0.05$) and NABA (MI: 0.511 ± 0.176 ABSU versus NICP: 0.363 ± 0.171 ABSU, $P < 0.001$). In addition, significant correlations between NABA and CABA were reported for NICP group ($r = 0.5776$, $P < 0.001$), and for MI group ($r = 0.3991$, $P < 0.05$), as shown in Fig. 1. Intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) were 2.6% and 4.6% for NABA, and 4.3% and 5.2% for CABA, respectively.

ROC curve was employed to quantify the overall ability of CABA and NABA to discriminate among those individuals with myocardial ischemia and those without myocardial ischemia. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.6582 (95% CI, 0.5444 to 0.7720, $P < 0.05$), and 0.7800 (95% CI, 0.6785 to 0.8816, $P < 0.001$), respectively. Thus, both CABA and NABA have ability to discriminate myocardial ischemia, as shown in Fig. 2. CABA levels < 0.450 ABSU demonstrated a sensitivity of 61.7% (95% CI, 48.7% to 73.6%) and a specificity of 53.1% (34.7% to 70.9%) for assessment of myocardial ischemia, and the negative and positive predictive values (NPV and PPV) were 72.7% and 41.5%, respectively. NABA levels < 0.500 ABSU demonstrated a sensitivity of 78.1% (95% CI, 66.0% to 87.5%) and a specificity of 65.6% (46.8% to 81.4%) for assessment of myocardial ischemia, and the NPV and PPV were 82.0% and 60.0%, respectively.

Discussion

Currently, available myocardial infarction markers, such as CK-MB, myoglobin, and troponin, appear to be released from myocyte sources only after irreversible cellular damage and disruption of cell membrane integrity. Furthermore, shorter episodes of ischemia do not consistently result in elevated blood levels of these markers (Brogan, 1997; Bar-Or, 2000). In those cases when abnormal myocardial infarction marker results are reported following myocardial ischemia, there is usually a delay of several hours after the onset of symptoms

before abnormal levels can be detected (Bar-Or, 2000). Bar-Or et al. (2000) first suggested that myocardial ischemia may alter the metal binding capacity of circulating serum albumin and proposed a new blood assay based on ischemia-induced alterations of the binding capacity of HSA to exogenous cobalt.

Although the nickel-HSA binding has already been previously described (Bar-Or, 2001), to our knowledge, this is the first report to demonstrate the characteristics of a nickel-HSA binding assay for assessment of myocardial ischemia. This study indicates that patients with MI have reduced nickel binding to HSA thus a blood assay based on this mechanism was proposed. Biochemical properties of albumin to bind transition metals such as nickel and cobalt have already been previously reported (Bar-Or, 2001). Nickel(II) and copper(II) deserve special consideration among the metals because most mammalian albumins bind them more tightly and more specifically than other cations. Cysteine participates in the uptake of copper, and copper binds preferentially to mercaptalbumin and in time forms an albumin-copper-cysteine complex. Nickel(II) binds to the amino terminus in a similar manner. The nickel ion chiefly participates in a square-planar chelate ring like copper, but about 30% of the ligand is said to be held in an octahedral structure, which is less stable (Peters, 1995).

NABA values were higher in patients with myocardial infarction. NABA measures unbound nickel remaining after nickel-albumin binding occurred. Thus, with reduced nickel-albumin binding there is more unbound nickel, resulting in elevated NABA levels. Ischemia may alter the metal binding capacity of circulating serum albumin, and biochemical mechanisms involved in the *in vivo* alterations to metal-albumin binding during either ischemia or reperfusion may include hypoxia, acidosis, free radical damage, membrane energy-dependent sodium and calcium pump disruptions, free iron, and copper ion exposure (Berenshtein, 1997; Bar-Or, 2000; Christenson, 2001; Cichota, 2008). Most of these conditions occur *in vivo* within minutes after the onset of acute myocardial ischemia (Reimer, 1977; Cobbe, 1980; Bar-Or, 2000). The first three amino acids in the N-terminus, Asp-Ala-His, constitute a specific binding site for transition metals and the most susceptible region for degradation compared with other regions of albumin (Sbarouni, 2006; Cho, 2007, Duarte, 2009). Generation of ROS can transiently modify the N-terminal region of albumin and produce an increase in IMA levels (Roy, 2006). The cobalt-HSA binding assay mechanism of action is an interplay among multiple variables including the proportion of intact N-terminus of HSA, HSA concentration, plasma cysteine/cystine ratio, plasma pH, and the state of oxidation of cys34 of HSA (and potentially others). These factors all interact with added cobalt and DTT (Bar-Or, 2008). Furthermore, it is known that HSA is the primary binder of

fatty acids, commonly known as free fatty acids (FFA), and that plasma concentrations of FFAs are increased during myocardial ischemia. Bhagavan et al. (2009) described that changes in IMA values during acute myocardial infarction are likely caused by reversible conformational changes in HSA associated with FFA fluxes (Bhagavan, 2009). Likewise, we suggest that these variables may interact also with added nickel and DTT on NABA.

We suggested that NABA reflects ischemia, but it can also reflect necrosis due to high concentrations of cTnI observed in MI group. Thus, total acute occlusion of the culprit artery causes acute tissue necrosis that prevails over ischemia limiting access of the modified HSA to the systemic circulation. Therefore, with myocardial necrosis less albumin will be exposed to circulating free radicals resulting in lesser IMA production. Because of the difficulty of pinpointing the exact time of onset of an ischemic event, there is always the possibility that IMA was initially raised but had already decreased below the diagnostic cut-off at the time of the blood draw. These intriguing findings do not detract from the fact that IMA is a sensitive marker of ischemia (rather than necrosis) (Sinha, 2004).

Results of this preliminary study indicate that emergency patients with myocardial infarction have reduced nickel and cobalt binding to HSA when measured by colorimetric assay. We also describe a significant correlation between CABA and NABA. ROC curve analysis of CABA and NABA were consistent with these observations. The sensitivity and NPV of NABA were higher than those of CABA, indicating that NABA may have a rule out role better than CABA. However, the discriminatory power of NABA as a rule out test would not be sufficient for clinical application and further studies are required. The specificity and PPV of CABA and NABA were low because the metal binding capacity of albumin for transition metals could be influenced by various factors, including several ischemic conditions (Lee, 2007). The binding of transition metals to the N-terminal region of albumin has been studied. However, the exact biochemical mechanism that causes altered nickel(II) binding to albumin during ischemia is not understood. We suggest that differences on clinical characteristics of assays reported in this study could be attributed in part due to a variety of factors including chemical characteristics of each metal, molecular weight, as well as their abilities of binding to HSA.

Conclusions

In summary, the present study reported a method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel and its diagnostic characteristics. We conclude that altered nickel binding to HSA may prove to be an early marker of ischemia, and the assay described here could have an important role in reducing the inappropriate admission of low-risk patients. However, its diagnostic specificity was low, indicating that NABA should be performed in combination with markers of necrosis. Thus, the discriminatory power of NABA as a rule out test would not be sufficient for clinical application and further studies are required to investigate the power of this test in a larger population.

Declaration of interest

This study was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, process number 477843/2008-5). CNPq and FAPERGS provided fellowships.

References

- Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. (2001). Characterization of the Co^{2+} and Ni^{2+} binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 268:42-7.
- Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. (2000). A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 19:311-5.
- Bar-Or D, Rael LT, Bar-Or R, et al. (2008). The cobalt-albumin binding assay: Insights into its mode of action. *Clin Chim Acta* 387:120-7.
- Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. (1997). Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *J Mol Cell Cardiol* 29:3025-34.

- Bhagavan NV, Ha JS, Park JH, et al. (2009). Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia-modified albumin: a pilot study. *Clin Chem* 55:1588-90.
- Brogan GX, Hollander JE, McCuskey CF, et al. (1997). Evaluation of a new assay for cardiac troponin I vs. creatine kinase-MB for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Acad Emerg Med* 4:6-12.
- Cho DK, Choi JO, Kim SH, et al. (2007). Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. *Coron Artery Dis* 18:83-7.
- Christenson RH, Azzazy HME. (1998). Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 44:1855-64.
- Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al. (2001). Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 47:464-70.
- Cichota LC, Moresco RN, Duarte MMMF, Silva JEP. (2008). Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 22:1-5.
- Cobbe SM, Poole-Wilson PA. (1980). The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 12:745-60.
- Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, et al. (2006). Utility of admission cardiac troponin and "Ischemia Modified Albumin" measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg Med J* 23:256-61.
- Duarte MMMF, Rocha JBT, Moresco RN, et al. (2009). Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 42:666-71.
- Keating L, Bengier JR, Beetham R, et al. (2006). The PRIMA Study: presentation ischaemia-modified albumin in the emergency department. *Emerg Med J* 23:764-8.
- Lee YW, Kim HJ, Cho YH, Shin HB, Choi TY, Lee YK. (2007). Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 384:24-7.
- Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. (2007). Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. *Clin Chem Lab Med* 45:261-2.
- Moresco RN, Vargas LCR, Halla-Júnior R, Silla LMR. (2005). Lack of association between cardiac troponin T and D-dimer in the evaluation of myocardial damage. *J Clin Lab Anal* 19:282-84.

Peacock F, Morris DL, Anwaruddin S, et al. (2006). Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department. *Am Heart J* 152:253-62.

Peters T (1995). All About Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125521109>. Accessed on 22 October 2009.

Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. (1977). The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 56:786-94.

Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. (2006). Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. *Heart* 92:113-4.

Sbarouni E, Georgiadou P, Theodorakis GN, Kremastinos DT. (2006). Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. *J Am Coll Cardiol* 48:2482-4.

Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. (2004). Role of "ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 21:29-34.

The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee. (2000). Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. *Eur Heart J* 21:1502-13.

Table 1. Baseline characteristics of study patients

	Nonischemic chest pain	Myocardial infarction
N	64	32
Male (%)	48.4	53.1
Age (years)	64.9 ± 14.5	73.4 ± 9.9**
Albumin (g/L)	35.30 ± 4.78	33.56 ± 5.22
cTnI (ng/mL)	< 0.20	58.38 ± 21.45***
CABA (ABSU)	0.369 ± 0.202	0.479 ± 0.197*
NABA (ABSU)	0.384 ± 0.165	0.555 ± 0.171***

Data are expressed as mean ± SD.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

CABA, Cobalt-albumin binding assay; NABA, Nickel-albumin binding assay.

Figure 1

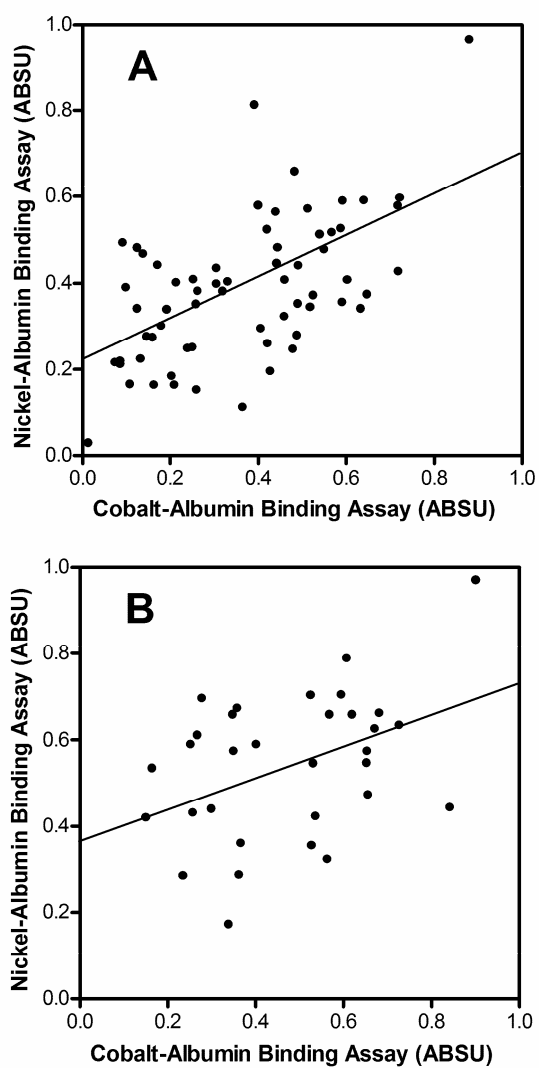


Figure 1. Significant correlations between NABA and CABA for (A) nonischemic chest pain group ($r=0.5776$, $P<0.001$), and (B) myocardial infarction group ($r=0.3991$, $P<0.05$). Results are expressed as absorbance units. NABA: Nickel-albumin binding assay; CABA: Cobalt-albumin binding assay.

Figure 2

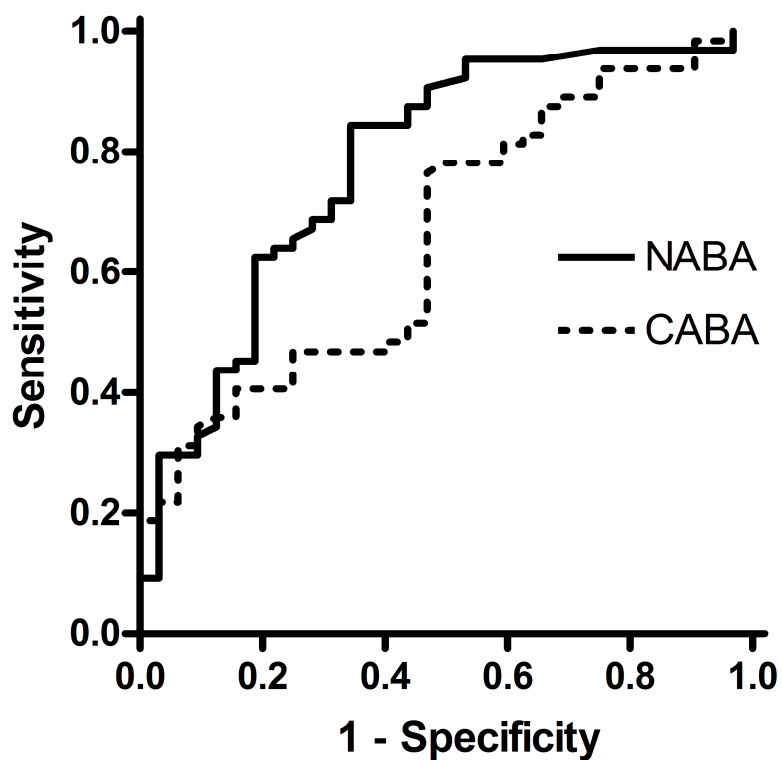


Figure 2. ROC curves of CABA and NABA for assessment of myocardial infarction. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.6582 (95% CI, 0.5444 to 0.7720, $P < 0.05$), and 0.7800 (95% CI, 0.6785 to 0.8816, $P < 0.001$), respectively. NABA: Nickel-albumin binding assay; CABA: Cobalt-albumin binding assay.

4.2 Manuscrito II

Submetido para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine

ASSESSMENT OF NICKEL-ALBUMIN BINDING ASSAY FOR DIAGNOSIS OF ACUTE CORONARY SYNDROME

Sandra Huber da Silva^{1,2}, Renata da Silva Pereira^{1,2}, Bruna dos Santos Hausen¹, Cristiane Signor¹, Marli Matiko Anraku de Campos^{1,2}, Rafael Noal Moresco^{1,2,*}

¹Laboratório de Bioquímica Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

²Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

***Corresponding Author:** Rafael Noal Moresco

Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 1402, Camobi, 97105-900, Santa Maria-RS, Brazil.

Tel.: +55 55 32208941; Fax: +55 55 32208018

E-mail: rnmoresco@yahoo.com.br

Running title: Nickel-albumin binding and acute coronary syndrome

Number of words of the manuscript (excluding Abstract, References): 2269

Number of references: 29

Number of Tables/Figures: 1 Table / 1 Figure

ABSTRACT

Background: Myocardial ischemia may alter the metal binding capacity of circulating serum albumin. Thus, the aim of this study was to describe an automated method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel and to evaluate the diagnostic characteristics of this assay for the assessment of acute coronary syndrome (ACS) in patients presenting to the emergency room (ER) with acute chest pain.

Methods: We assessed the levels of cardiac troponin I (cTnI), serum albumin, ischemia-modified albumin (IMA) measured by cobalt-albumin binding assay (CABA), and a by an automated nickel-albumin binding assay (NABA) in the following groups: ACS and non-ischemic chest pain (NICP). Biochemical markers were determined in blood samples obtained from patients within 3 h of ER admission.

Results: cTnI, CABA and NABA levels were higher in ACS group in comparison to the NICP group. A significant correlation between NABA and CABA was observed ($r=0.5506$, $P<0.001$). Areas under the curve for CABA and NABA were 0.7289 and 0.7582, respectively. Both CABA and NABA have ability to discriminate ACS, however, NABA has a slightly higher ability to discriminate ACS than CABA.

Conclusions: Patients with ACS have reduced nickel binding to human serum albumin, and NABA may have an important role as an early marker of myocardial ischemia, particularly in patients presenting to the ER with acute chest pain.

Keywords: Acute coronary syndrome; ischemia-modified albumin; myocardial ischemia; nickel; serum albumin.

Introduction

Acute coronary syndrome (ACS) includes the diagnosis of unstable angina (UA), non-ST segment elevation myocardial infarction (NSTEMI), and ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) (1). The results of angiographic and angioscopic studies suggest that UA/NSTEMI often result from the disruption or erosion of an atherosclerotic plaque with a subsequent cascade of pathological processes decreasing the coronary blood flow (2). Early detection of cardiac ischemia by assessment of the symptoms, risk factors, electrocardiogram (ECG), physical examination, and laboratory tests provide worthy clues guiding the physician in management of ACS. Nevertheless, none of the conventional methods, ECG, biochemical markers of myocardial necrosis, and imaging techniques can be considered the gold standard for the diagnosis of ischemia (1).

Biochemical markers of necrosis including myoglobin, creatine kinase-MB, and particularly cardiac troponin I (cTnI) and T (cTnT) play a fundamental role in the diagnosis, risk stratification, and therapeutic management of ACS patients (3-5), however, they are limited by their insufficient sensitivity for reflecting the reversible ischemic condition in the initial onset period (6). During ischemia, the generation of reactive oxygen species (ROS) influences the metal binding capacity of albumin for transition metals (7-9). Recently, a novel biochemical method measuring ischemia-induced alterations of the binding capacity of human serum albumin (HSA) to exogenous cobalt has been reported (10). Ischemia-modified albumin (IMA) has been shown to be a rapid rising and sensitive biochemical marker especially for the diagnosis of myocardial ischemia (10,11). IMA is considered to be a marker of myocardial ischemia in contrast to cardiac enzymes that are released when cardiac necrosis occurs (12). Blood levels of IMA rise quickly after the onset of ischemia (within 5 to 10 min) and continue to rise while the condition persists (13). Admission measurement of IMA can be used for early classification of patients presenting to the emergency room (ER) to assist in their triage (14) since negative IMA has a high negative predictive value to exclude acute coronary syndromes (15). IMA plasma concentration measured in patients with acute myocardial infarction (AMI) within 24 h of hospital admission is a strong predictor of cardiac outcome during the first 1 year and may help to identify patients requiring more aggressive medical management after hospital discharge (16). However, some authors do not support the use of IMA as an effective risk stratification tool for patients with chest pain in the ER, particularly because of its low specificity (17).

Studies to develop novel methods and markers predicting ischemia even minimally, in the absence of myocardial necrosis, are still being conducted (1). There is therefore a need for a strategy to detect ischemia before necrosis occurs and conduct prompt revascularization (18). The early prediction of ischemia is important and it may improve the ability to recognize stratify acute chest pain patients and guide therapeutic decisions. Thus, considering the importance of biochemical markers of ischemia, the purpose of this study was to describe an automated method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel and to evaluate the diagnostic characteristics of this assay for the assessment of ACS in patients presenting to the ER with acute chest pain.

Materials and methods

Patients

Patients from the University Hospital of Santa Maria-RS, Brazil, were enrolled prospectively in this study. A total of 129 chest pain patients presenting to the ER with clinical signs and symptoms of ACS were recruited for this study in the 10-month period between November 2008 and August 2009. However, 40 patients were excluded from the final analysis as a result of inaccuracy of timing for sample acquisition. The remaining 89 patients were divided into two groups as follows: ACS (n=63, mean age \pm SD, 61.9 \pm 11.7 years), and non-ischemic chest pain (NICP) (n=26, mean age \pm SD, 65.3 \pm 18.4 years). Practice guidelines for the redefinition of AMI and the management of patients with UA were used to diagnose ACS (2,19). Patients were classified as NICP when: (a) a reported noncardiac mechanism was confirmed as the cause of pain; (b) negative cTnI results on serial sampling, and (c) presence of normal ECG. This study protocol was approved by the local ethics committee (number 0180.0.243.000-08).

Biochemical determinations

All blood samples were collected from patients within 3 h of ER admission. After obtaining blood samples in Vacutainer[®] (BD Diagnostics, Plymouth, UK) tubes without anticoagulants, specimens were routinely centrifuged for 15 min at 2500 g within 1 h of collection, and aliquots of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks

before measurements of albumin and IMA assayed by cobalt-albumin binding assay (CABA) and nickel-albumin binding assay (NABA). Serum levels of cTnI were measured by use of a chemiluminescence immunoassay on Immulite 2000[®] (Siemens Healthcare Diagnostics, Los Angeles, USA), and albumin levels were measured by use of bromocresol green method on Cobas Mira[®] (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) analyzer. Serum IMA was measured on Cobas MIRA[®] automated analyzer by a colorimetric cobalt-albumin binding assay (CABA) previously described (20). An automated technique to measure the ischemia-induced alterations of the binding capacity of human serum albumin to exogenous nickel is described here based on manual spectrophotometer assay previously reported by our team (21). Briefly, 50 μ L of patient serum was pipetted to the reaction cuvette on the Cobas MIRA[®] analyzer, and 50 μ L of 1.9 mM nickel sulfate (Sigma, NiSO₄.6H₂O) in H₂O was added 25 seconds later. The sample/nickel mixture was incubated for 275 seconds to allow binding of nickel to albumin then a blank read optical measurement was made at 500 nm. A total of 50 μ L of 3.2 mM dithiothreitol (DTT) (Sigma) in H₂O was added 25 seconds later. DTT reacted with unbound (non N-terminal sequestered) nickel to form a colored product. The final reaction mixture was incubated for an additional time of 100 seconds and read at 500 nm. All incubations were at 37°C. Results were expressed in absorbance units (ABSU). The colorimetric assay format quantitatively measures with unbound nickel remaining after nickel-albumin binding has occurred. Thus, with reduced nickel-albumin binding there was more unbound nickel, resulting in elevated assay levels. Intraassay and interassay coefficients of variation (CVs) were 2.1% and 5.1% for NABA, and 4.3% and 5.2% for CABA, respectively.

Statistical analysis

Mann-Whitney *U* test was used to evaluate the differences between groups. Categorical data were summarized as percentages, and comparisons between groups were performed with Fisher's exact test. Spearman correlation was assessed to evaluate the association between NABA and CABA. Receiver operator characteristic (ROC) curve was performed to quantify the overall ability of NABA and CABA to discriminate among those individuals with ACS and those without ACS. The sensitivity and specificity of such assays were assessed by ROC curve. Statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

Results

Baseline characteristics of study patients are shown in Table 1. Among the 63 ACS patients, 31 had STEMI, 27 had NSTEMI, and 5 had UA. A non-cardiac cause of chest pain was identified for all patients of the NCIP group. The levels of cTnI were higher in the ACS group in comparison to the NICP group. No significant differences were observed for serum albumin levels between the two groups. The levels of IMA measured by CABA were higher in patients with ACS (0.585 ± 0.127 versus 0.488 ± 0.102 ABSU, $P < 0.001$).

We also observed higher levels of NABA in the ACS group (0.526 ± 0.129 versus 0.414 ± 0.081 ABSU, $P < 0.001$), as shown in Table 1. We used an albumin adjusted correction (22) to evaluate the influence of albumin levels on CABA and NABA values in the participants studied, and differences between groups remained significant after correction, as follows: CABA (ACS: 0.592 ± 0.128 ABSU versus NICP: 0.496 ± 0.142 ABSU, $P < 0.001$) and NABA (ACS: 0.536 ± 0.143 ABSU versus NICP: 0.415 ± 0.084 ABSU, $P < 0.001$). In addition, a significant correlation between NABA and CABA was observed ($r = 0.5506$, $P < 0.001$). ROC curve was employed to quantify the overall ability of CABA and NABA to discriminate among those individuals with ACS and those without ACS. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.7289 (95% CI, 0.6113 to 0.8466, $P < 0.001$) and 0.7582 (95% CI, 0.6543 to 0.8622, $P < 0.001$), respectively. Thus, both CABA and NABA have ability to discriminate ACS, however, NABA has a slightly higher ability to discriminate ACS than CABA, as shown in Fig. 1. At a cut-off value of 0.550 ABSU, CABA demonstrated a sensitivity of 76.9% (95% CI, 56.3% to 91.0%) and a specificity of 65.9% (52.8% to 77.4%) for the assessment of ACS, and the positive and negative predictive values (PPV and NPV) were 87.2% and 47.6%, respectively. At a cut-off value of 0.480 ABSU, NABA demonstrated a sensitivity of 86.5% (95% CI, 67.5% to 96.6%) and a specificity of 57.1% (44.1% to 69.5%) for the assessment of ACS, and the PPV and NPV were 90.0% and 44.9%, respectively.

Discussion

Currently, available myocardial infarction markers appear to be released from myocyte sources only after irreversible cellular damage and disruption of cell membrane

integrity. Furthermore, shorter episodes of ischemia do not consistently result in elevated blood levels of these markers (10,23). In such cases when abnormal myocardial infarction marker results are reported following myocardial ischemia, there is usually a delay of several hours after the onset of symptoms before abnormal levels can be detected (10). Bar-Or et al. first suggested that myocardial ischemia may alter the metal binding capacity of circulating serum albumin and proposed a new blood assay based on ischemia-induced alterations of the binding capacity of HSA to exogenous cobalt (10). The nickel-HSA binding has already been previously described (24) and our team has previously reported a method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel and its diagnostic characteristics for the assessment of myocardial ischemia in patients presenting to the ER and definitively diagnosed with myocardial infarction (21).

Although the nickel-HSA binding has already been previously described, to our knowledge, this is the first report to demonstrate the characteristics of an automated nickel-HSA binding assay for the assessment of ACS. This study indicates that patients with ACS have reduced nickel binding to HSA. Thus, with reduced nickel-albumin binding there is more unbound nickel, resulting in elevated NABA levels. Myocardial ischemia generates free radicals, develops acidosis and hypoxia, releases free iron and copper ions, and disrupts the membrane energy-dependent sodium and calcium pump ions (4,8,10,25). HSA is a scavenger for divalent metal ions. It may thus be postulated that in ischemia, these processes may result in change in the ability of the N-terminus to bind to transition metal ions. The release of these ions likely initiates one potential pathway for IMA generation (18). Most of these conditions occur *in vivo* within minutes after the onset of AMI (12,26). The first three amino acids in the N-terminus, Asp-Ala-His, constitute a specific binding site for transition metals and the most susceptible region for degradation compared with other regions of albumin (9,12,27). Generation of ROS can transiently modify the N-terminal region of albumin and produce an increase in IMA levels (7). It is known that HSA is the primary binder of fatty acids, commonly known as free fatty acids (FFA), and that plasma concentrations of such acids are increased during myocardial ischemia. Bhagavan et al. described that changes in IMA values during acute myocardial infarction are likely caused by reversible conformational changes in HSA associated with FFA fluxes (28).

Results of this preliminary study indicate that emergency patients with ACS have reduced nickel and cobalt binding to HSA when measured by an automated colorimetric assay. We also described a significant correlation between CABA and NABA. ROC curve analysis of CABA and NABA were consistent with these observations and both tests have

ability to discriminate ACS, however, NABA has a slightly higher ability to discriminate ACS than CABA. The PPV of NABA was higher than the PPV of CABA, indicating that NABA may have a better role for diagnosis of ACS than CABA. However, the discriminatory power of NABA as a confirmatory test would not be sufficient for clinical application and further studies are required. Biochemical properties of albumin to bind transition metals such as nickel and cobalt have already been previously reported (24), but the exact biochemical mechanism that causes altered nickel(II) binding to albumin during ischemia is not yet understood. Nickel(II) and copper(II) deserve special consideration among the metals because most mammalian albumins bind them more tightly and more specifically than other cations. Cysteine participates in the uptake of copper, and copper binds preferentially to mercaptalbumin and in time forms an albumin-copper-cysteine complex. Nickel(II) binds to the amino terminus in a similar manner. The nickel ion chiefly participates in a square-planar chelate ring like copper, but about 30% of the ligand is said to be held in an octahedral structure, which is less stable (29).

The present study reported a simple, fast, and inexpensive automated method to measure ischemia-induced alterations of the binding capacity of serum albumin to exogenous nickel and its diagnostic characteristics. The phenomenon of altered nickel binding to HSA may prove to be an early biochemical marker of ischemia on the assessment of ACS, particularly in patients presenting to the ER with acute chest pain. However, its diagnostic specificity was low, indicating that NABA should be performed in combination with markers of necrosis. Further studies are required to investigate the clinical applicability of this test in a larger population, particularly with regard to utilizing this technique in combination with other diagnostic strategies.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brazil, process number 477843/2008-5). CNPq and FAPERGS provided fellowships.

Conflict of Interest

None declared.

References

1. Aparci M, Kardesoglu E, Ozmen N, Ozcan O, Cebeci BS, Cingozbay BY, et al. Prognostic significance of ischemia modified albumin in patients with acute coronary syndrome. *Coron Artery Dis* 2007;18:367-73.
2. Anderson JL, Adams CD, Antman EM, Bridges CR, Califf RM, Casey DE Jr, et al. ACC/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:e1-e157.
3. Christenson RH, Azzazy HM. Biochemical markers of the acute coronary syndromes. *Clin Chem* 1998;44:1855-64.
4. Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, Wu AH, Holtman V, Painter P, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001;47:464-70.
5. Moresco RN, Vargas LC, Júnior RH, Rocha Silla LM. Lack of association between cardiac troponin T and D-dimer in the evaluation of myocardial damage. *J Clin Lab Anal* 2005;19:282-4.
6. Lee YW, Kim HJ, Cho YH, Shin HB, Choi TY, Lee YK. Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2007;384:24-7.
7. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischemia modified albumin. *Heart* 2006;92:113-4.
8. Cichota LC, Moresco RN, Duarte MM, da Silva JE. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. *J Clin Lab Anal* 2008;22:1-5.
9. Duarte MM, Rocha JB, Moresco RN, Duarte T, Da Cruz IB, Loro VL, et al. Association between ischemia-modified albumin, lipids and inflammation biomarkers in patients with hypercholesterolemia. *Clin Biochem* 2009;42:666-71.
10. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311-5.
11. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of ischemia modified albumin, a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004;21:29-34.

12. Sbarouni E, Georgiadou P, Theodorakis GN, Kremastinos DT. Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2482-4.
13. Sinha MK, Gaze DC, Tippins JR, Collinson PO, Kaski JC. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. *Circulation* 2003;107:2403-5.
14. Collinson PO, Gaze DC, Bainbridge K, Morris F, Morris B, Price A, et al. Utility of admission cardiac troponin and Ischemia Modified Albumin measurements for rapid evaluation and rule out of suspected acute myocardial infarction in the emergency department. *Emerg Med J* 2006;23:256-61.
15. Peacock F, Morris DL, Anwaruddin S, Christenson RH, Collinson PO, Goodacre SW, et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department. *Am Heart J* 2006;152:253-62.
16. Van Belle E, Dallongeville J, Vicaut E, Degrandart A, Baulac C, Montalescot G. Ischemia-modified albumin levels predict long-term outcome in patients with acute myocardial infarction. The French Nationwide OPERA study. *Am Heart J* 2010;159:570-6.
17. Keating L, Bengier JR, Beetham R, Bateman S, Veysey S, Kendall J, et al. The PRIMA study: presentation ischaemia-modified albumin in the emergency department. *Emerg Med J* 2006;23:764-8.
18. Gaze DC. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. *Drug Metab Pharmacokinet* 2009;24:333-41.
19. Thygesen K, Alpert JS, White HD. Universal Definition of Myocardial Infarction. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2173-95.
20. Kaefer M, Piva SJ, De Carvalho JAM, Da Silva DB, Becker AM, Coelho AC, et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Clin Biochem* 2010;43:450-4.
21. Da Silva SH, Hausen BS, Silva DB, Becker AM, Campos MMA, Duarte MMMF, et al. Characteristics of a nickel-albumin binding assay for assessment of myocardial ischaemia. *Biomarkers* 2010;15:353-7.
22. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:261-2.
23. Brogan GX, Hollander JE, McCuskey CF, Thode HC Jr, Snow J, Sama A, et al. Evaluation of a new assay for cardiac troponin I vs. creatine kinase-MB for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Acad Emerg Med* 1997;4:6-12.

24. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co^{2+} and Ni^{2+} binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. *Eur J Biochem* 2001;268:42-7.
25. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3025-34.
26. Reimer KA, Lowe JE, Rasmussen MM, Jennings RB. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. *Circulation* 1977;56:786-94.
27. Cho DK, Choi JO, Kim SH, Choi J, Rhee I, Ki CS, et al. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. *Coron Artery Dis* 2007;18:83-7.
28. Bhagavan NV, Ha JS, Park JH, Honda SA, Rios CN, Sugiyama C, et al. Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia-modified albumin: a pilot study. *Clin Chem* 2009;55:1588-90.
29. Peters T. All About Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125521109>. Accessed: 22 October 2009.

Table 1. Baseline characteristics of study patients

	Nonischemic chest pain	Acute coronary syndrome
Age (years)	65.3 ± 18.4	61.9 ± 11.7
Male (%)	65.4	60.3
Hypertension (%)	57.7	82.5*
Family history of CAD (%)	0	39.7**
Diabetes mellitus (%)	26.9	42.9
Dyslipidemia (%)	3.8	23.8*
Smokers (%)	0	38.0**
Albumin (g/L)	36.54 ± 6.09	36.87 ± 5.10
cTnI (ng/mL)	<0.20	45.84 ± 19.95**
CABA (ABSU)	0.488 ± 0.102	0.585 ± 0.127**
NABA (ABSU)	0.414 ± 0.081	0.526 ± 0.129**

Data are expressed as mean ± SD. *P<0.05, **P<0.001.

CAD, Coronary artery disease; CABA, Cobalt-albumin binding assay; NABA, Nickel-albumin binding assay.

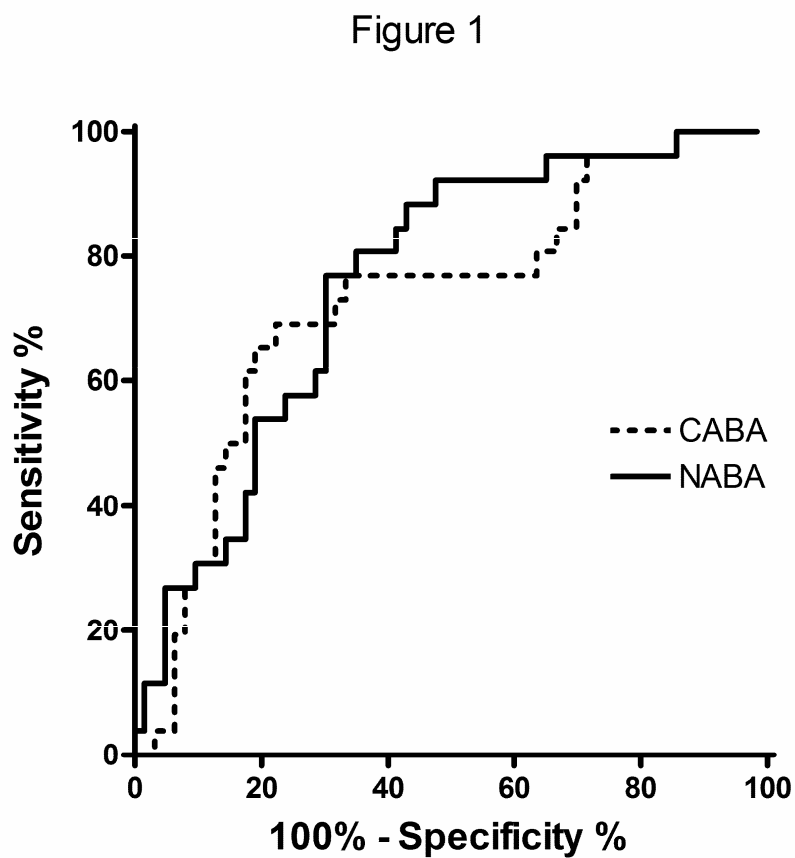


Figure 1. ROC curves of CABA and NABA for assessment of ACS. Areas under the curve for CABA and NABA were 0.7289 (95% CI, 0.6113 to 0.8466, $P < 0.001$) and 0.7582 (95% CI, 0.6543 to 0.8622, $P < 0.001$), respectively. ACS: Acute coronary syndrome; CABA: Cobalt-albumin binding assay; NABA: Nickel-albumin binding assay.

5 DISCUSSÃO

Bar-Or et al. (2000) foi o primeiro a sugerir que a isquemia miocárdica pode alterar a capacidade de ligação da albumina sérica a metais de transição, propondo então um ensaio baseado na capacidade de ligação da albumina ao cobalto exógeno (CABA) (BAR-OR et al., 2000). Embora a ligação do níquel à albumina já tenha sido descrita anteriormente (BAR-OR et al., 2001), este estudo foi o primeiro a descrever um teste de ligação da albumina ao níquel (NABA) e apresentar as características diagnósticas desse teste na avaliação da isquemia miocárdica em pacientes com síndrome coronariana aguda (SCA).

No manuscrito I foi descrito um método laboratorial capaz de detectar as alterações induzidas pela isquemia miocárdica na capacidade de ligação da albumina ao níquel exógeno, sendo verificado que os pacientes com IAM apresentaram uma capacidade reduzida de ligação da albumina ao níquel. A isquemia pode alterar a capacidade de ligação da albumina sérica a metais, sendo que os mecanismos bioquímicos que envolvem *in vivo* estas alterações durante a isquemia ou reperfusão podem incluir hipóxia, o desenvolvimento de acidose, danos por radicais livres, ruptura da bomba voltagem-dependente de sódio e cálcio, e liberação de íons ferro e cobre (BERENSHTEIN et al., 1997; BAR-OR et al., 2000; CHRISTENSON et al., 2001; CICHOTA et al., 2008). Muitas destas condições ocorrem *in vivo* dentro de minutos após o início da isquemia miocárdica aguda (REIMER et al., 1977; COBBE e POOLE-WILSON, 1980; BAR-OR et al., 2000).

Além disso, foi observada uma correlação significativa entre o NABA descrito em nosso estudo e o CABA previamente estabelecido (BAR-OR et al., 2000). A área sob a curva observada para o NABA foi discretamente maior à observada para o CABA na detecção do IAM. A sensibilidade e o VPN observados para o NABA também foram maiores, o que indica que esse teste apresenta uma capacidade levemente superior ao CABA na exclusão diagnóstica do IAM. No entanto, seu poder discriminatório como teste de exclusão pode ainda não ser suficiente para a aplicação clínica na avaliação dos pacientes com dor torácica, sendo necessário a realização de estudos adicionais. A especificidade e o valor preditivo positivo (VPP) do NABA e do CABA observadas no manuscrito I foram baixos, o que indica que a capacidade de ligação da albumina a metais de transição pode ser influenciada por vários fatores, incluindo as diversas condições isquêmicas em outros órgãos (LEE et al., 2007).

No manuscrito II foi descrito um protocolo automatizado para o NABA adaptado ao analisador bioquímico Cobas Mira, sendo também avaliadas as características diagnósticas desse ensaio automatizado em pacientes com dor torácica com suspeita diagnóstica de SCA. Foi demonstrado que os pacientes com SCA apresentaram níveis elevados de NABA e CABA, indicando uma reduzida capacidade de ligação da albumina ao níquel e ao cobalto, respectivamente, confirmando os resultados do primeiro manuscrito. Também foi observada uma correlação significativa entre o NABA e o CABA mensurados no sistema automatizado. A análise da curva ROC demonstrou que ambos os testes tiveram habilidade em detectar os pacientes com SCA, porém, o NABA obteve uma habilidade ligeiramente superior nesta detecção, conforme também observado no ensaio manual previamente descrito.

Os valores de VPP e sensibilidade observados para o NABA foram maiores do que os observados para o CABA, o que permite sugerir que o ensaio baseado na ligação da albumina ao níquel apresenta uma capacidade superior para detecção da SCA quando comparado ao ensaio que utiliza o cobalto. No entanto, o poder discriminatório do NABA para diagnóstico da SCA pode ainda não ser suficiente para a sua aplicação clínica na avaliação dos pacientes com dor torácica, sendo necessário a avaliação em conjunto com outros biomarcadores de necrose (cTn), o que poderia contribuir para o aumento da sensibilidade e do VPP no diagnóstico da SCA em pacientes com dor torácica atendidos nos serviços de emergência.

Os primeiros três aminoácidos do N-terminal, aspartato-alanina-histidina, constituem um sítio específico de ligação a metais de transição, e esta é a região mais suscetível à degradação quando comparada a outras regiões da albumina (CHAN et al., 1995). A geração de ERO pode modificar transitoriamente o N-terminal da albumina e produzir uma elevação nos níveis de IMA (ROY et al., 2006). Sabe-se que a albumina é o principal vinculante de ácidos graxos, comumente conhecidos como FFA, e que tais ácidos estão aumentados durante a isquemia miocárdica. Bhagavan et al. (2009) descreveram que alterações nos valores de IMA durante o IAM são, provavelmente, causadas por mudanças conformacionais reversíveis na molécula de albumina associadas ao fluxo aumentado de FFA (BHAGAVAN et al., 2009).

Em relação à ligação da albumina a metais, o níquel e o cobre merecem atenção especial, pois se ligam mais fortemente e mais especificamente à albumina do que outros cátions (PETERS, 1995). Dessa forma, é possível sugerir que, tendo o níquel esta maior habilidade de ligação ao N-terminal da albumina e uma maior especificidade de ligação a este N-terminal quando intacto, o ensaio utilizando o níquel seria mais eficaz na detecção da isquemia miocárdica, conforme apresentado nos dois manuscritos. Considerando que o N-terminal é a região da albumina mais susceptível à degradação e que o níquel apresenta maior

afinidade pelo N-terminal do que o cobalto, é possível inferir que a ligação da albumina ao cobalto seja mais susceptível a outros fatores além daqueles associados à isquemia propriamente dita, o que poderia reduzir a sensibilidade e a especificidade do ensaio. Com isso, o ensaio utilizando o níquel pode ter apresentado um desempenho superior, mesmo que discreto, em virtude da maior especificidade desse metal pelo principal sítio da albumina a sofrer degradação (ou modificação) nas situações de isquemia. A ligação de metais de transição ao N-terminal da albumina vem sendo extensivamente estudada, entretanto, o exato mecanismo bioquímico pelo qual ocorre a alteração na ligação do níquel à albumina durante a isquemia não está totalmente elucidado. Sua geração pode ser alvo de futuras pesquisas para a compreensão desta ligação e sua influência nos processos isquêmicos. Nós sugerimos que as diferenças nas características clínicas relatadas neste estudo podem ser atribuídas a uma variedade de fatores, incluindo as características químicas de cada metal, como o peso molecular, raio atômico, assim como as suas diferentes habilidades em vincularem-se às diversas regiões da albumina.

Entre os pacientes com SCA definida, um tratamento precoce pode reduzir a extensão do dano miocárdico. Estes pacientes caem em duas grandes categorias: (a) aqueles que se apresentam na emergência hospitalar logo após o início do IAM, nos quais a cTn I/T ou a CK-MB ainda não estão detectáveis no sangue; e (b) aqueles que se apresentam com isquemia miocárdica sem necrose, como nos casos de AI (MORROW et al., 2003). Nestes casos, quando resultados anormais dos marcadores de infarto são relatados após isquemia do miocárdio, geralmente há um atraso em várias horas após o início dos sintomas característicos, antes que os níveis anormais possam ser detectados (BAR-OR, LAU e WINKLER, 2000). No entanto, com o advento dos ensaios ultra-sensíveis para detecção das cTn, o tempo decorrido entre a liberação da cTn do cardiomiócito e sua detecção laboratorial vem reduzindo significativamente (REICHLIN et al., 2009). Apesar disto, um biomarcador que realmente detecte isquemia miocárdica na ausência de necrose acrescentaria substancialmente às atuais ferramentas clínicas. Este marcador ideal deve persistir em uma forma detectável (estável) por um tempo suficiente para fornecer um diagnóstico conveniente e diminuir seus níveis dentro de 24 horas para poder detectar uma isquemia recorrente, além de ter um ensaio simples e ser executado em um curto período de tempo (MORROW et al., 2003). Portanto, com este objetivo, neste estudo foi desenvolvido e relatado um método automatizado simples, rápido e pouco dispendioso baseado na alteração induzida pela isquemia na capacidade de ligação da albumina ao níquel, que se mostrou mais eficaz do que o teste de ligação da albumina ao cobalto; porém, devido à sua baixa cardioespecificidade,

este teste pode ter maior valor diagnóstico se avaliado em combinação com as troponinas cardíacas, especialmente se estas forem mensuradas pelos métodos ultra-sensíveis recentemente desenvolvidos.

6 CONCLUSÕES

- Os pacientes com isquemia do miocárdio apresentaram uma redução na capacidade de ligação da albumina ao níquel, sendo desenvolvido nesse estudo um método laboratorial espectrofotométrico capaz de detectar essa alteração.
- O teste de ligação da albumina ao níquel desenvolvido foi adaptado ao sistema automatizado Cobas Mira[®], possibilitando uma redução no volume final de amostra e de reagentes, bem como uma redução no tempo de análise.
- O teste de ligação da albumina ao níquel foi eficaz na identificação da isquemia do miocárdio em pacientes atendidos no serviço de emergência com o diagnóstico de síndrome coronariana aguda, além de ter apresentado um potencial papel na exclusão diagnóstica do IAM e no diagnóstico da SCA em virtude de seus significativos valores preditivos negativo e positivo, respectivamente.
- Tanto o teste de ligação da albumina ao níquel quanto o teste de ligação da albumina ao cobalto foram capazes de detectar a isquemia do miocárdio, porém, o ensaio utilizando o níquel demonstrou uma habilidade discretamente superior no diagnóstico da SCA, o que permite concluir que o tipo de metal (níquel ou cobalto) influencia nas características diagnósticas do ensaio.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM, S. S.; KEY, N. S.; GREEMBERG, C. S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v. 113, n. 13, p. 2878-2887, 2009.

AMIRTHARAJ, G. J. et al. Fatty acids influence binding of cobalt to serum albumin in patients with fatty liver. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1782, n. 5, p. 349-354, 2008.

ANDERSON, J. L. et al. ACC/AHA 2007 Guidelines for the management of patients with unstable angina/ non-ST-elevation myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 7, p. e1-e157. 2007.

APPLE, F. S. et al. Future biomarkers for detection of ischemia and risk stratification in acute coronary syndrome. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 5, p. 810-824, 2005.

ARMSTRONG, E. J.; MORROW, D. A.; SABATINE, M. S. Inflammatory biomarkers in acute coronary syndromes: Part IV: Matrix metalloproteinases and biomarkers of platelet activation. **Circulation**, v. 113, n. 9, p. e382-e385, 2006.

AVEZUM, A. et al. III Diretriz sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 83, n. s4, p. 1-86, 2004.

AZZAZY, H. M.; PELSERS, M. M.; CHRISTENSON, R. H. Unbound free fatty acids and heart-type fatty acid-binding protein: diagnostic assays and clinical applications. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 19-29, 2006.

BABUIN, L.; JAFFE, A. S. Troponin: the biomarker of choice for the detection of cardiac injury. **Canadian Medical Association Journal**, v. 173, n. 10, p. 1191-1202, 2005.

BALDUS, S. et al. Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes. **Circulation**, v. 108, n. 12, p. 1440-1445, 2003.

BALLMER, P. E. Causes and mechanisms of hypoalbuminaemia. **Clinical Nutrition**, v. 20, n. 3, p. 271-273, 2001.

BAR-OR, D. et al. Reduction in the cobalt binding capacity of human albumin with myocardial ischemia. **Annals of Emergency Medicine**, v. 34, n. 4, p. S56, 1999.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. **The Journal of Emergency Medicine**, v. 19, n. 4, p. 311-315, 2000.

BAR-OR, D. et al. Characterization of the Co^{+2} and Ni^{+2} binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin: an insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n.1, p. 42-47, 2001.

BAR-OR, D. et al. Reduced albumin-cobalt binding with transient myocardial ischemia after elective percutaneous transluminal coronary angioplasty: a preliminary comparison to creatine-kinase-MB, myoglobin, and troponin I. **American Heart Journal**, v. 141, n. 6, p. 985-991, 2001.

BAR-OR, D. et al. The cobalt-albumin binding assay: insights into its mode of action. **Clinica Chimica Acta**, v. 387, n. 1-2, p. 120-127, 2008.

BASSAND, J. P. et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of non-ST-segment elevation acute coronary syndromes. **European Heart Journal**, v. 28, n. 13, p. 1598-1660, 2007.

BAYES-GENIS, A. et al. D-Dimer is an early diagnostic marker of coronary ischemia in patients with chest pain. **American Heart Journal**, v. 140, n. 3, p. 379-384, 2000.

BAYES-GENIS, A. et al. Pregnancy-associated plasma protein a as a marker of acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 14, p. 1022-1029, 2001.

BERENSHTEIN, E. et al. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 11, p. 3025-3034, 1997.

BHAGAVAN, N. V. et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 4, p. 581-585, 2003.

BHAGAVAN, N. V. et al. Utility of serum fatty acid concentrations as a marker for acute myocardial infarction and their potential role in the formation of ischemia-modified albumin: a pilot study. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1588-1590, 2009.

BODOR, G. S. et al. Development of monoclonal antibodies for an assay of cardiac troponin-I and preliminary results in suspected cases of myocardial infarction. **Clinical Chemistry**, v. 38, n. 11, p. 2203-2214, 1992.

BRITTON, C. V.; HERNANDES, A.; ROBERTS, R. Plasma creatine kinase isoenzyme determinations in infants and children- Characterization in normal patients and after cardiac catheterization and surgery. **Chest**, v. 77, n. 6, p. 758-760, 1980.

BROGAN Jr, G. X., et al. Evaluation of a new rapid quantitative immunoassay for serum myoglobin versus CKMB for ruling out acute myocardial infarction in the emergency department. **Annals of Emergency Medicine**, v. 24, n. 4, p. 665-671, 1994.

CARBALLAL, S. et al. Sulfenic acid in human serum albumin. **Amino Acids**, v. 32, n. 4, p. 543-551, 2007.

CASELLA FILHO, A. et al. Inflamação e aterosclerose: integração de novas teorias e valorização dos novos marcadores. **Revista Brasileira de Cardiologia Invasiva**, v. 11, n. 3, p. 14-19, 2003.

CELIK, T. et al. Matrix metalloproteinases in acute coronary syndromes: a new therapeutic target? **International Journal of Cardiology**, v. 134, n. 3, p. 402-404, 2009.

CHAN, B. et al. Site-specific N-terminal auto degradation of human serum albumin. **European Journal of Biochemistry**, v. 227, n. 1-2, p. 524-528, 1995.

CHRISTENSON, R. H. et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. **Clinical Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 464-470, 2001.

CICHOTA, L. C. et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in anemia associated to chronic kidney disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 22, n. 1, p. 1-5, 2008.

CLEARFIELD, M. B. C-reactive protein: a new risk assessment tool for cardiovascular disease. **The Journal of the American Osteopathic Association**, v. 105, n. 9, p. 409-416, 2005.

COBBE, S. M.; POOLE-WILSON, P. A. The time of onset and severity of acidosis in myocardial ischemia. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 12, n. 8, p. 745-760, 1980.

COLLINSON, P. O.; GAZE, D. C. Biomarkers of cardiovascular damage and dysfunction-an overview. **Heart, Lung and Circulation**, v. 16, supl. 3, p. S71-S82, 2007.

CONSUEGRA-SANCHEZ, L. et al. Ischemia-modified albumin predicts short-term outcome and 1-year mortality in patients attending the emergency department for acute ischemic chest pain. **Heart and Vessels**, v. 23, n. 3, p. 174-180, 2008.

CREEMERS, E. E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial Infarction: A new approach to prevent heart failure? **Circulation Research**, v. 89, n. 3, p. 201-210, 2001.

DANNE, O. et al. Prognostic implications of elevated whole blood choline levels in acute coronary syndromes. **The American Journal of Cardiology**, v. 91, n. 9, p. 1060-1067, 2003.

DANNE, O. et al. Whole blood choline and plasma choline in acute coronary syndromes: prognostic and pathophysiological implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 383, n. 1-2, p. 103-109, 2007.

DAVIES, M. J. et al. Intramyocardial platelet aggregation in patients with unstable angina suffering sudden ischemic cardiac death. **Circulation**, v. 73, n. 3, p. 418-427, 1986.

DE FERRANTI, S.; RIFAI, N. C-reactive protein and cardiovascular disease: a review of risk prediction and interventions. **Clinica Chimica Acta**, v. 317, n. 1-2, p. 1-15, 2002.

DE LEMOS, J. A. et al. The prognostic value of B-type natriuretic peptide in patients with acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 14, p. 1014-1021, 2001.

DE LEMOS, J. A.; MCGUIRE, D. K.; DRAZNER, M. A. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. **Lancet**, v.362, n. 9380, p. 316-322, 2003.

FAGAN, G. J. et al. The albumin cobalt binding test: Analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). **Journal of Clinical Ligand Assay**, v. 25, n. 2, p. 178-187, 2002.

FALKENSAMMER, J. et al. Serum levels of ischemia-modified albumin in healthy volunteers after exercise-induced calf-muscle ischemia. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 4, p. 535-540, 2007.

FDA. **New test to rule out heart attack**. 2003. Disponível em: <<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/psn/printer.cfm?id=120>>. Acesso em: 20 mai. 2010.

FUTTERMAN, L. G.; LEMBERG, L. Novel markers in the acute coronary syndrome: BNP, IL-6, PAPP-A. **American Journal of Critical Care**, v. 11, n. 2, p. 168-172, 2002.

GAZE, D. C.; CROMPTON, L.; COLLINSON, P. Ischemia-modified albumin concentrations should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations. **Medical Principles and Practice**, v.15, n. 4, p. 322-324, 2006.

GAZE, D. C. Ischemia modified albumin: a novel biomarker for the detection of cardiac ischemia. **Drug Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 24, n. 4, p. 333-341, 2009.

GONZÁLVEZ, M. et al. Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in patients with ST-segment elevation acute myocardial infarction. **Revista Española de Cardiología**, v. 60, n. 12, p. 1233-1241, 2007.

GUNDUZ, A. et al. Ischemia-modified albumin levels in cerebrovascular accidents. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 26, n. 8, p. 874-878, 2008.

HACKER, M. et al. Effects of peripheral vascular intervention on ischemia-modified albumin. **Coronary Artery Disease**, v. 18, n. 5, p. 375-379, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARRIS, T. B., et al. Associations of elevated interleukin-6 and C-reactive protein levels with mortality in the elderly. **The American Journal of Medicine**, v. 106, n. 5, p. 506-512, 1999.

HEESCHEN, C. et al. Soluble CD40 ligand in acute coronary syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 12, p. 1104-1111, 2003.

HEESCHEN, C. et al. Prognostic value of placental growth factor in patients with acute chest pain. **The Journal of the American Medical Association**, v. 291, n. 4, p. 435-441, 2004.

HENN, V. et al. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 1047-1054, 2001.

HJORTSHØJ, S. et al. Kinetics of ischaemia modified albumin during ongoing severe myocardial ischaemia. **Clinica Chimica Acta**, v. 403, n. 1-2, p. 114-120, 2009.

HJORTSHØJ, S.; KRISTENSEN, S. R.; RAVKILDE J. Diagnostic value of ischemia-modified albumin in patients with suspected acute coronary syndrome. **American Journal of Emergency Medicine**, v. 28, n. 2, p. 170-176, 2010.

HUO, Y.; LEY, K. Adhesion molecules and atherogenesis. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 173, n. 1, p. 35-43, 2001.

IMMANUEL, S.; SANJAYA, A. I. Albumin cobalt binding (ACB) test: its role a novel marker of acute coronary syndrome. **Acta Medica Indonesiana**, v. 38, n. 2, p. 92-96, 2006.

JANUZZI, J. L. et al. The N-terminal pro-BNP investigation of dyspnea in the emergency department. **The American Journal of Cardiology**, v. 95, n. 8, p. 948-954, 2005.

KAEFER, M. et al. Association between ischemia modified albumin, inflammation and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 4-5, p. 450-454, 2010.

KATUS, H. A. et al. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 21, n. 12, p. 1349-1353, 1989.

KEATING, L. et al. The PRIMA study: presentation ischaemia-modified albumin in the emergency department. **Emergency Medicine Journal**, v. 23, n. 10, p. 764-768, 2006.

KLEINFELD, A. M. et al. Increases in serum unbound free fatty acid levels following coronary angioplasty. **The American Journal of Cardiology**, v. 78, n. 12, p. 1350-1354, 1996.

KRAGH-HANSEN, U.; CHUANG, V. T. G.; OTAGIRI, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, n. 6, p. 695-704, 2002.

LAUSSAC, J. P.; SARKAR, B. Characterization of the Copper (II) and Nickel (II) transport site of human serum albumin. Studies of Copper (II) and Nickel (II) binding to peptide 1-24 of human serum albumin by C and H NMR spectroscopy. **Biochemistry**, v. 23, n. 12, p. 2832-2838, 1984.

LAWRENCE, J. B. et al. The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 6, p. 3149-3153, 1999.

LEE, Y. W. et al. Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. **Clinica Chimica Acta**, v. 384, n. 1-2, p. 24-27, 2007.

LENDERINK, T. et al. Elevated placental growth factor levels are associated with adverse outcomes at four-year follow-up in patients with acute coronary syndromes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 47, n. 2, p. 307-311, 2006.

LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 868-874, 2002.

LIEDTKE, A. J. Alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the acutely ischemic heart. **Progress in Cardiovascular Diseases**, v. 23, n. 5, p. 321-336, 1981.

LINDMARK, E. et al. Relationship between interleukin 6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or noninvasive strategy. **The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 17, p. 2107-2113, 2001.

LIPPI, G. et al. Potential value for new diagnostic markers in the early recognition of acute coronary syndromes. **Canadian Journal of Emergency Medical Care**, v. 8, n. 1, p. 27-31, 2006.

LIPPI, G. et al. Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 45, n. 2, p. 261-262, 2007.

LOPEZ, A. D.; MATHERS, C. D. Measuring the global burden of disease and epidemiological transitions: 2002-2030. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 100, n. 5-6, p. 481-499, 2006.

LUND, J. et al. Circulating pregnancy-associated plasma protein A predicts outcome in patients with acute coronary syndrome but no troponin I elevation. **Circulation**, v. 108, n. 16, p. 1924-1926, 2003.

MARGARSON, M. P.; SONI, N. Serum albumin: touchstone or totem? **Anaesthesia**, v. 53, n. 8, p. 789- 803, 1998.

MARTÍN-VENTURA, J. L. et al. Biomarkers in Cardiovascular Medicine. **Revista Española de Cardiología**, v. 62, n. 6, p. 677-688, 2009.

McCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. **The New England Journal of Medicine**, v. 312, n. 3, p. 159-163, 1985.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Indicadores e dados básicos 2008 – Taxa de Mortalidade Específica por Doenças do Aparelho Circulatório em 2006**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?idb2008/c08.def>> Acesso em: 09 abr. 2010.

MORESCO, R. N., et al. Lack of association between cardiac troponin T and D-dimer in the evaluation of myocardial damage. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 19, n. 6, p. 282-284, 2005.

MORROW, D. A. et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia. **Clinical Chemistry**, v.49, n. 4, p. 537-539, 2003.

MORROW, D. A. et al. National Academy of Clinical Biochemistry Laboratory Medicine Practice Guidelines: Clinical characteristics and utilization of biochemical markers in acute coronary syndromes. **Clinical Chemistry**, v. 53, n.4, p. 552-574, 2007.

NICOLAU, J. C. et al. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST (II edição, 2007). **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 89, n. 4, p. e89-e131, 2007.

O'DONOGHUE, M.; MORROW, D. A. The future of biomarkers in the management of patients with acute coronary syndromes. **Current Opinion in Cardiology**, v. 23, n. 4, p. 309-314, 2008.

OGAWA, A. et al. Difference in elevation of N-terminal pro-BNP and conventional cardiac markers between patients with ST elevation vs non-ST elevation acute coronary syndrome. **Circulation Journal**, v. 70, n. 11, p. 1372-1378, 2006.

PACKARD, R. R. S.; LIBBY, P. Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2008.

PANTEGHINI, M. Diagnostic application of CK-MB mass determination. **Clinica Chimica Acta**, v. 272, n. 1, p. 23-31, 1998.

PEACOCK, F. et al. Meta-analysis of ischemia-modified albumin to rule out acute coronary syndromes in the emergency department. **American Heart Journal**, v. 152, n. 2, p. 253-262, 2006.

PETERS, T. **All About Albumin: biochemistry, genetics, and medical applications**. 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/book/9780125521109>> Acesso em: 22 October 2009.

PIEGAS, L. S. et al. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretriz da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre tratamento do infarto agudo do miocárdio com supradesnível do segmento ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 93, n.6(supl. 2), p. e179-e264, 2009.

PIWOWAR, A.; KNAPIK-KORDECKA, M.; WARWAS, M. Ischemia-modified albumin level in type 2 diabetes mellitus- Preliminary report. **Disease Markers**, v. 24, n. 6, p. 311-317, 2008.

POLK, J. D. et al. Clinical utility of the cobalt-albumin binding assay in the diagnosis of intestinal ischemia. **The Journal of Trauma**, v. 64, n. 1, p. 42-45, 2008.

QUINLAN, G. J.; MARTIN, G. S.; EVANS, T. W. Albumin: Biochemical properties and therapeutic potential. **Hepatology**, v. 41, n. 6, p. 1211-1219, 2005.

RADI, R. et al. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 286, n. 1, p. 117-125, 1991.

REICHLIN, T. et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. **The New England Journal of Medicine**, v.361, n. 9, p. 858-867, 2009.

REIMER, K. A., et al. The wavefront phenomenon of ischemic cell death. 1. Myocardial infarct size vs. duration of coronary occlusion in dogs. **Circulation**, v. 56, n. 5, p. 786-794, 1977.

RIDKER, P. M. et al. Plasma concentration of cross-linked fibrin degradation product (D-dimer) and the risk of future myocardial infarction among apparently healthy men. **Circulation**, v. 90, n. 5, p. 2236-2240, 1994.

RIDKER, P. M. et al. Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increase risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. **Circulation**, v. 101, n. 18, p. 2149-2153, 2000.

ROCHE, M. et al. The antioxidant properties of albumin. **FEBS Letters**, v. 582, n. 13, p. 1783-1787, 2008.

ROY, D. et al. Ischemia Modified Albumin for the assessment of patients presenting to the emergency department with acute chest pain but normal or non-diagnostic 12-lead electrocardiograms and negative cardiac troponin T. **International Journal of Cardiology**, v. 97, n. 2, p. 297-301, 2004.

ROY, D. et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart**, v. 92, n. 1, p. 113-114, 2006.

SADLER, P. J.; TUCKER, A.; VILES, J. H. Involvement of a lysine residue in the N-terminal Ni²⁺ and Cu²⁺ binding site of serum albumins. Comparison with Co²⁺, Cd²⁺ and Al³⁺. **European Journal of Biochemistry**, v. 220, n. 1, p. 193-200, 1994.

SCHÖNBECK, U. et al. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. **Circulation**, v. 104, n. 19, p. 2266-2268, 2001.

SCHREIER, T.; KEDES, L.; GAHLMANN, R. Cloning, structural analysis, and expression of the human slow twitch skeletal muscle/cardiac troponin C gene. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 34, p. 21247-21253, 1990.

SCIRICA, B. M. et al. Clinical application of C-reactive protein across the spectrum of acute coronary syndromes. **Clinical Chemistry**, v. 53, n. 10, p. 1800-1807, 2007.

SHEN, X. et al. Assessment of ischemia-modified albumin levels for emergency room diagnosis of acute coronary syndrome. **International Journal of Cardiology**, in press, 2010.

SINGH, V. et al. Cardiac biomarkers- the old and the new: a review. **Coronary Artery Disease**, v. 21, n. 4, p. 244-256, 2010.

SINHA, M. K. et al. Ischemia modified albumin is a sensitive marker of myocardial ischemia after percutaneous coronary intervention. **Circulation**, v. 107, n. 19, p. 2403-2405, 2003.

SINHA, M. K. et al. Role of "Ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. **Emergency Medicine Journal**, v. 21, n. 1, p. 29-34, 2004.

SQUIRE, I. B. et al. Plasma MMP-9 and MMP-2 following acute myocardial infarction in man: correlation with echocardiographic and neurohumoral parameters of left ventricular dysfunction. **Journal of Cardiac Failure**, v. 10, n. 4, p. 328-333, 2004.

STORROW, A. B.; GIBLER, W. B. Chest pain centers: diagnosis of acute coronary syndromes. **Annals of Emergency Medicine**, v. 35, n. 5, p. 449-461, 2000.

THYGESEN, K. et al. Universal definition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 50, n. 22, p. 2173-2195, 2007.

TRACY, R. P. Inflammation in cardiovascular disease: cart, horse, or both? **Circulation**, v. 97, n. 20, p. 2000-2002, 1998.

TUREDİ, S. et al. The value of ischemia-modified albumin compared with D-dimer in the diagnosis of pulmonary embolism. **Respiratory Research**, v. 9, n. 1, p. 49, 2008.

TURHAN, H. et al. Plasma soluble adhesion molecules; intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in patients with isolated coronary artery ectasia. **Coronary Artery Disease**, v. 16, n. 1, p. 45-50, 2005.

UHING, M. R. The albumin controversy. **Clinics in Perinatology**, v. 31, n. 3, p. 475-488, 2004.

VAN DER VUSSE, G. J. et al. Critical steps in cellular fatty acid uptake and utilization. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 239, n. 1-2, p. 9-15, 2002.

WANG, T. J. et al. Plasma natriuretic peptide levels and risk of cardiovascular events and death. **The New England Journal of Medicine**, v. 350, n. 7, p. 655-663, 2004.

WORSTER, A. et al. Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 13, p. 1685-1690, 2005.

ZAPICO-MUÑIZ, E. et al. Ischemia-modified albumin during skeletal muscle ischemia. **Clinical Chemistry**, v. 50, n. 6, p. 1063-1065, 2004.

ZHANG, R. et al. Association between myeloperoxidase levels and risk of coronary artery disease. **The Journal of the American Medical Association**, v. 286, n. 17, p. 2136-2142, 2001.

ANEXO A – Separata do artigo publicado no periódico Biomarkers

ANEXO B – Comprovante de submissão do manuscrito II para publicação no periódico Clinical Chemistry and Laboratory Medicine