

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

José Pedro Etchepare Cassol

**EFEITOS DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A
QUANTIFICAÇÃO DA ALBUMINA PELOS ENSAIOS
IMUNOTURBIDIMÉTRICO E COLORIMÉTRICO**

Santa Maria, RS
2021

José Pedro Etchepare Cassol

**EFEITOS DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DA
ALBUMINA PELOS ENSAIOS IMUNOTURBIDIMÉTRICO E COLORIMÉTRICO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como
requisito parcial para obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

Santa Maria, RS
2021

Cassol, José Pedro Etchepare
Efeitos da carbamilação in vitro sobre a quantificação da albumina pelos ensaios imunoturbidimétrico e colorimétrico / José Pedro Etchepare Cassol.- 2021.
65 f.; 30 cm

Orientador: Rafael Noal Moresco
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2021

1. Albumina 2. Albuminúria 3. Interferência 4. Carbamilação 5. Imunoturbidimetria I. Moresco, Rafael Noal II. Título.

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

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

José Pedro Etchepare Cassol

EFEITOS DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DA ALBUMINA PELOS ENSAIOS IMUNOTURBIDIMÉTRICO E COLORIMÉTRICO

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

Aprovado em 05 de novembro de 2021:



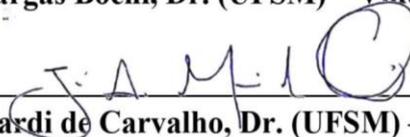
Rafael Noal Moresco, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



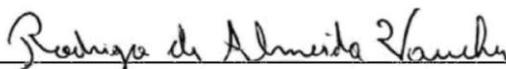
Fábio Vasconcelos Comim, Dr. (UFMG) – Videoconferência



Guilherme Vargas Bochi, Dr. (UFSM) – Videoconferência



José Antônio Mainardi de Carvalho, Dr. (UFSM) – Videoconferência



Rodrigo de Almeida Vaucher, Dr. (UFPel) – Videoconferência

Santa Maria, RS

2021

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, pois acredito que sem Ele nada disso seria possível.

À minha família, que sempre me incentivou em cada etapa dessa trajetória.

Ao meu orientador, Professor Dr. Rafael Noal Moresco, pelo voto de confiança para execução deste trabalho, os aprendizados adquiridos por mim no decorrer do processo e a paciência com seus alunos. Um atendimento na Biblioteca Central que virou uma chance de doutorado. Agradeço a oportunidade de ter feito parte de seu grupo de pesquisa. Um exemplo de professor, pesquisador e orientador.

Gostaria de agradecer a avaliação do meu exame de qualificação pelo professor Luís Flávio Souza de Oliveira, que infelizmente não se encontra mais entre nós. Um dos professores que mais me inspirou durante a graduação e, apesar de não ter sido orientado por ele, sabia da responsabilidade do mesmo com a docência e a pesquisa. Um exemplo de ser humano, de professor e de pesquisador. Será sempre lembrado por todos da 3ª Turma de Farmácia da UNIPAMPA, nosso eterno paraninfo. Agradeço todo o incentivo descrito a mim naquele documento. Receba o meu agradecimento e meu abraço onde estiveres.

Aos demais componentes da banca, agradeço pela disponibilidade de leitura, avaliação e contribuição para os ajustes finais, melhorando ainda mais a qualidade do trabalho.

Ao colega de laboratório Rogério Scolari, um grande amigo que ganhei durante a jornada, que me ajudou principalmente nos experimentos iniciais. Uma amizade que levarei para toda vida.

Aos demais colegas do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica (LaBiClin), que me receberam muito bem e me deram todas as dicas dos equipamentos e rotinas do laboratório.

Um agradecimento mais que especial à colega servidora Terezinha Noeli Portel Kruger, a Teka, que não media esforços e estava sempre disponível para ajudar, principalmente com as trocas de horários. Muito Obrigado! Tens grande parte nessa vitória.

Aos demais colegas servidores da Biblioteca Central que me incentivavam e torciam por mim.

À colega de doutorado Jéssica Brandão Reolon, velha conhecida dos tempos de graduação e mestrado da UNIPAMPA. A parceira para resolver os problemas burocráticos que surgiam durante o trajeto. Deixo meu agradecimento especial.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Por fim, agradeço a todos, que, direta ou indiretamente, tiveram alguma contribuição no desenvolvimento deste trabalho. MUITO OBRIGADO!

RESUMO

EFEITOS DA CARBAMILAÇÃO *IN VITRO* SOBRE A QUANTIFICAÇÃO DA ALBUMINA PELOS ENSAIOS IMUNOTURBIDIMÉTRICO E COLORIMÉTRICO

AUTOR: José Pedro Etchepare Cassol

ORIENTADOR: Rafael Noal Moresco

A albumina é uma proteína globular não glicosilada de baixo peso molecular que apresenta diferentes funções, como a manutenção da pressão osmótica coloidal e o transporte de diversas substâncias. É a principal proteína presente no plasma. A albumina plasmática encontra-se diminuída em diversas situações clínicas, inclusive em situações associadas à perda da mesma na urina, conhecidas como albuminúria. Normalmente, quantidade significativa de albumina filtrada pelo glomérulo é reabsorvida pelos túbulos contorcidos proximais, e apenas uma concentração abaixo de 30 mg/24h é encontrada nas amostras de urina. Além disso, a albumina sérica tem um valor de referência entre 3,5-5,2 g/dL. Vários métodos estão disponíveis para quantificar a albumina em amostras de soro e urina. Na prática clínica, os ensaios colorimétricos mensuram a proteína no soro, enquanto os métodos imunológicos são empregados para quantificar a albumina na urina. As doenças que acometem os rins, como a doença renal crônica, afetam as concentrações de albumina no soro e na urina. Portanto, essa proteína é um biomarcador para investigar alguns distúrbios. Além disso, as patologias renais podem prejudicar a produção de urina e promover o acúmulo de substâncias no sangue, como a ureia. A ureia é degradada em amônia e cianato, responsáveis pelo processo de carbamilação de proteínas. Essa modificação pós-traducional não enzimática causa alterações nas propriedades e funções da albumina, que aceleram o envelhecimento molecular por meio da formação de grupos carbamil. Nenhum estudo avaliou a interferência da carbamilação da albumina nas concentrações urinárias medidas pelo método imunoturbidimétrico. Além disso, nenhum estudo analisou o impacto desse processo no método colorimétrico utilizado para quantificar a albumina em níveis compatíveis com a normalidade e hipo e hiperalbuminemia. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a interferência da carbamilação da albumina nos ensaios imunoturbidimétrico e colorimétrico usados para mensurar essa proteína em amostras de urina e soro, respectivamente. As soluções de albumina humana foram preparadas em PBS 0,1 mol/L pH 7,4 em concentrações adequadas para os ensaios pelos respectivos métodos. A indução *in vitro* da carbamilação ocorreu com o uso de seis concentrações diferentes de cianato de potássio (em concentrações milimolares), já bem caracterizada em estudos anteriores. As soluções foram incubadas em microtubos por 48h a 37°C. Após o tempo estabelecido, as amostras foram analisadas em analisador de bioquímica clínica automatizado BS380 por meio de ensaios imunoturbidimétrico e colorimétrico disponíveis comercialmente. A adição de concentrações crescentes de cianato de potássio levou a uma subestimação significativa ($p < 0,001$) dos níveis de albumina, tanto urinária medida por imunoturbidimetria (9,7-24,0%) quanto sérica medida por ensaio colorimétrico (13,4-27,3%). Portanto, a adição de um agente carbamilante em diferentes concentrações sobre as soluções de albumina causou uma subestimação dos resultados medidos por ambas as técnicas. Esses achados podem estar relacionados a alterações nas moléculas causadas pela carbamilação, que modificam a ligação com o anticorpo específico no ensaio imunoturbidimétrico e a capacidade de ligação com ligantes no ensaio colorimétrico.

Palavras-chave: Albumina; Albuminúria; Interferência; Carbamilação; Imunoturbidimetria; Verde de bromocresol.

ABSTRACT

EFFECTS OF *IN VITRO* CARBAMYLATION ON ALBUMIN QUANTIFICATION BY IMMUNOTURBIDIMETRIC AND COLORIMETRIC TESTS

AUTHOR: José Pedro Etchepare Cassol

ADVISOR: Rafael Noal Moresco

Albumin is a low-molecular-weight non-glycosylated globular protein with several functions, such as maintaining colloidal osmotic pressure and transporting various substances. It is the main protein present in plasma. Plasma albumin is decreased in several clinical situations, including situations associated with the loss of albumin in the urine, known as albuminuria. Usually, a significant amount of albumin filtered by the glomerulus is reabsorbed by the proximal convoluted tubules, and only a concentration below 30 mg/24h is found in urine samples. Additionally, serum albumin has a reference value between 3.5-5.2 g/dL. Several methods are available for quantifying albumin in serum and urine samples. In clinical practice, colorimetric assays measure serum protein, while immunological methods are employed to quantify albumin in the urine. Diseases that affect the kidneys, such as chronic kidney disease, affect albumin concentrations in serum and urine. Therefore, this protein is a biomarker for investigating some disorders. In addition, kidney pathologies may impair urine production and promote the accumulation of substances in the blood, such as urea. Urea is degraded into ammonia and cyanate, which is responsible for the protein carbamylation process. This non-enzymatic post-translational modification cause changes in albumin properties and functions, which accelerate molecular aging through the formation of carbamyl groups. No studies assessed the interference of albumin carbamylation in urinary concentrations measured by the immunoturbidimetric method. Besides, no studies analyzed the impact of this process in the colorimetric method used to quantify albumin at levels compatible with normality and hypo and hyperalbuminemia. Therefore, this study aimed to evaluate the interference of albumin carbamylation on immunoturbidimetric and colorimetric assays used to measure this protein in urine and serum samples, respectively. Human albumin solutions were prepared at concentrations suitable for assay by the respective methods in PBS 0.1 mol/L pH 7.4. *In vitro* induction of carbamylation occurred by using six different concentrations of potassium cyanate (in millimolar concentrations), already well characterized in previous studies. The solutions were incubated in microtubes for 48h at 37°C. After the established time, the samples were analyzed in an automated clinical biochemistry analyzer BS380 using commercially available immunoturbidimetric and colorimetric assays. The addition of increasing concentrations of potassium cyanate led to a significant underestimation ($p < 0.001$) of albumin levels, both urinary measured by immunoturbidimetry (9.7-24.0%), as well as serum albumin measured by colorimetric assay (13.4-27.3%). Therefore, adding a carbamylating agent at different concentrations over albumin solutions caused an underestimation of the results measured by both techniques. These findings may be related to changes in the molecules caused by carbamylation, which modify the binding with the specific antibody in the immunoturbidimetric assay and the binding ability with ligands in the colorimetric assay.

Keywords: Albumin; Albuminuria; Interference; Carbamylation; Immunoturbidimetry; Bromocresol green.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Prognóstico da DRC utilizando a TFG e albuminúria.....	15
Figura 2 – Caminhos para a formação de proteínas carbamiladas <i>in vivo</i>	17
Figura 3 – Efeitos sistêmicos da carbamilação de proteínas.....	19
Figura 4 – Ativação do receptor LOX-1 em células endoteliais por LDLc e LDLox.	21
Figura 5 – Influência da carbamilação na mobilidade eletroforética da albumina. 2 µg do controle (A) ou de albumina carbamilada por KOCN por 1h (B), 2h (C) e 6h (D) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (m/v).	22
Figura 6 – Carbamilação da albumina sérica <i>in vitro</i> . (A) Espectro após eletroforese capilar mostrando o cálculo do fator de simetria, (B) Amostra controle (fator de simetria: 0,630), (C) Incubação com KOCN 1 mmol/L, (D) Incubação com KOCN 10 mmol/L e (E) Incubação com KOCN 150 mmol/L.....	24
Figura 7 – Fator de simetria da albumina sérica na amostra controle e em amostras em diferentes estágios de DRC.....	25
Figura 8 – Caracterização físico-química da albumina carbamilada. (A) Espectro UV/VIS, (B) Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier, (C) Espectro de fluorescência e (D) Espectro de Dicroísmo Circular.	26
Figura 9 – Estimativa de lisina pelo reagente TNBS em amostras de ASH nativa e albumina carbamilada.	27
Figura 10 – Razão AUC amida II/amida I entre os diferentes grupos.	28

ARTIGO CIENTÍFICO I – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA ALBUMINA URINÁRIA

Figure 1. Albumin levels quantified by immunoturbidimetry after the carbamylation procedure using different concentrations of KOCN for albumin solution prepared in PBS (1A) and prepared in a urine pool (1B). The results (expressed as mean and SD) are presented as a percentage of the original value of urinary albumin before carbamylation.....	45
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conteúdo de homocitrulina da albumina carbamilada.	23
Tabela 2 – Valores de albuminúria expressos de diferentes formas, dependentes da amostra de urina utilizada.	31

ARTIGO CIENTÍFICO I – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA ALBUMINA URINÁRIA

Table 1. Albumin measurement using the colorimetric bromocresol green method after the carbamylation	46
--	----

ARTIGO CIENTÍFICO II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO COLORIMÉTRICA DA ALBUMINA

Table 1. Albumin concentrations measured by BCG dye-based colorimetric assay after the carbamylation process using different concentrations of KOCN for human albumin solutions prepared in PBS.....	53
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADA	<i>American Diabetes Association</i> (Associação Americana de Diabetes)
AGES	Produtos finais de glicação avançada
AR	Artrite reumatoide
ASH	Albumina sérica humana
AUC	<i>Area under the curve</i> (Área sob a curva)
AVC	Acidente vascular cerebral
BCG	<i>Bromocresol green</i> (Verde de bromocresol)
BCP	<i>Bromocresol purple</i> (Púrpura de bromocresol)
CKD-EPI	<i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CML	Células musculares lisas
DM	Diabetes <i>mellitus</i>
DRC	Doença renal crônica
DRD	Doença renal do diabetes
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Hb	Hemoglobina
HbA _{1c}	Hemoglobina glicada
HbS	Hemoglobina S
HdI	Hemodiálise intermitente
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HDLc	Lipoproteína de alta densidade carbamilada
KOCN	Cianato de potássio
LCAT	Lecitina-colesterol aciltransferase
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LDLc	Lipoproteína de baixa densidade carbamilada
LDLg	Lipoproteína de baixa densidade glicada
LDLox	Lipoproteína de baixa densidade oxidada
LOX-1	Receptor LDL-1 oxidado do tipo lectina
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógeno
MPO	Mieloperoxidase
NUS	Nitrogênio ureico no sangue
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato salino)
POC	Pressão osmótica coloidal
RAC	Razão albumina/creatinina
SBD	Sociedade Brasileira do Diabetes
TFG	Taxa de filtração glomerular
TNBS	<i>Trinitrobenzenesulfonic acid</i> (Ácido trinitrobenzenosulfônico)

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	10
2	INTRODUÇÃO	11
3	OBJETIVOS	13
3.1	OBJETIVOS GERAIS	13
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
4.1	DOENÇAS RENAIS.....	14
4.2	CARBAMILAÇÃO DE PROTEÍNAS	16
4.3	ALBUMINA	30
4.4	ALBUMINÚRIA.....	30
4.5	MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA	32
5	ARTIGO CIENTÍFICO I – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA ALBUMINA URINÁRIA	35
	ABSTRACT	37
1.	INTRODUCTION.....	38
2.	MATERIALS AND METHODS	38
2.1.	SAMPLES.....	39
2.2.	<i>IN VITRO</i> CARBAMYLATION AND LABORATORY ANALYSIS.....	39
2.3.	STATISTICS.....	39
3.	RESULTS.....	40
4.	DISCUSSION	40
5.	CONCLUSION	42
	REFERENCES	42
6	ARTIGO CIENTÍFICO II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO COLORIMÉTRICA DA ALBUMINA	47
	LETTER TO THE EDITOR	48
	REFERENCES	51
7	DISCUSSÃO	54
8	CONCLUSÃO	58
	REFERÊNCIAS	59
	ANEXOS	65
	ANEXO A – ACEITE DO ARTIGO CIENTÍFICO II NO PERIÓDICO <i>CLINICAL LABORATORY</i>	65

1 APRESENTAÇÃO

As seções **MATERIAIS E MÉTODOS**, **RESULTADOS** e **DISCUSSÃO** encontram-se descritas nos **ARTIGOS CIENTÍFICOS I e II**, os quais representam a íntegra deste estudo.

Os itens “**DISCUSSÃO**” e “**CONCLUSÃO**”, descritos no final desta Tese, apresentam uma compilação geral das discussões e conclusões dos **ARTIGOS CIENTÍFICOS I e II**.

As **REFERÊNCIAS** citadas no final desta Tese estão relacionadas à **INTRODUÇÃO**, à **REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** e à **DISCUSSÃO**.

2 INTRODUÇÃO

As doenças renais são classificadas frequentemente com base na área do rim primariamente afetada, podendo ter origem glomerular, tubular ou intersticial (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). Entre elas, a doença renal crônica (DRC), que atinge 10% da população mundial (BRASIL, 2015), é definida como a presença de lesão ou diminuição da função renal por pelo menos três meses (MOTTA, 2009). Já a doença renal do diabetes (DRD) é uma complicação crônica que acomete entre 30 e 50% dos pacientes com diabetes *mellitus* (DM) (SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019), que segundo a OMS (2021), são mais de 422 milhões de pessoas no mundo, em sua maioria em países de média e baixa renda. Para avaliação da DRC e DRD são analisadas a taxa de filtração glomerular (TFG) através da creatinina sérica e a mensuração da albumina na urina (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013; SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019).

A albumina é uma proteína globular de pequeno peso molecular (66,4 kDa) que apresenta 17 pontes dissulfeto, responsáveis pela sua conformação molecular natural (PARIS et al., 2012). É a proteína plasmática mais abundante no sangue, chegando a concentrações superiores a 60% do total de proteínas (MOTTA, 2009). Níveis plasmáticos aumentados geralmente estão ligados à desidratação e não tem importância clínica. No entanto, níveis diminuídos relacionam-se a uma variedade de situações clínicas, entre elas, a excreção desta proteína pela urina, denominada albuminúria (BURTIS; BRUNS, 2016; MOTTA, 2009). Normalmente, grande parte dessa proteína filtrada pelo glomérulo é reabsorvida pelo túbulo contorcido proximal (LEZAIC, 2015), sendo eliminadas apenas pequenas concentrações de albumina na urina, que são indetectáveis se mensuradas pelo método do verde de bromocresol (BCG), tradicionalmente usado para a mensuração desta proteína em amostras de soro. Para amostras de urina, métodos imunológicos como a imunoturbidimetria, baseados na interação da albumina com um anticorpo específico, são os mais usados (MERRILL et al., 2016). Contudo, portadores de doenças renais acabam produzindo menos urina, apresentando níveis plasmáticos elevados de ureia, que se dissocia em amônia e cianato, esse último mantendo-se em equilíbrio com o isocianato, responsável por causar um processo chamado de carbamilação (DELANGHE et al., 2017b).

A carbamilação é uma modificação pós-traducional não enzimática irreversível que pode alterar a estrutura e a função de diversas proteínas no organismo, relacionando-se a várias patologias (KHAN; BHAT, 2019). Essa alteração estrutural de moléculas proteicas é

capaz de causar subestimação dos resultados. Em um estudo desenvolvido por Kok et al. (2014) foi avaliada a influência de carbamilação, induzida *in vitro* por concentrações de cianato de potássio (KOCN) a nível nmol/L, μ mol/L e mmol/L, sobre a mensuração de albumina em concentração de hiperalbuminemia por método imunonefelométrico, assim como em dois métodos colorimétricos. Quando comparado esse impacto, os autores encontraram uma subestimação significativa da proteína em diferentes proporções dependente do método e da concentração de KOCN utilizada. Nesses casos, a mensuração deve ocorrer por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas sequencial (MS/MS) (DELANGHE et al., 2017c), pois é capaz avaliar a presença de carbamilação, assim como mensurar as formas não carbamiladas. Entretanto, a CLAE é uma técnica incomum em laboratórios clínicos (HERMES et al., 2013), principalmente pelos seus altos custos (MORELLI, 2003).

Com base no exposto, estudos envolvendo a carbamilação da albumina ainda são incipientes. Não há estudos publicados que investigaram o impacto da carbamilação da albumina, induzida *in vitro*, sobre a sua quantificação através do método imunoturbidimétrico em níveis urinários tampouco o efeito do processo carbamilante sobre a mensuração colorimétrica da proteína citada em níveis plasmáticos considerados normais, afetando o prognóstico, diagnóstico e/ou o controle de doenças renais. Além disso, é um processo que pode competir com a glicação de proteínas *in vivo* (NICOLAS et al., 2018), influenciando também no monitoramento da glicemia em pacientes com diabetes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar os efeitos da carbamilação *in vitro* da albumina sobre a sua quantificação através de ensaios imunoturbidimétrico e colorimétrico comercialmente disponíveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o impacto da carbamilação induzida *in vitro* por diferentes concentrações de KOCN na mensuração da albumina em concentração urinária (200 mg/L), preparada em tampão PBS 0,1 mol/L pH 7,4, utilizando um método imunológico baseado no princípio imunoturbidimétrico comercialmente disponível;
- Analisar o impacto da carbamilação induzida *in vitro* por diferentes concentrações de KOCN na mensuração da albumina em concentração urinária (200 mg/L), preparada em pool de urina obtidas de indivíduos supostamente saudáveis, utilizando um método imunológico baseado no princípio imunoturbidimétrico comercialmente disponível;
- Avaliar o impacto da carbamilação induzida *in vitro* por diferentes concentrações de KOCN na quantificação da albumina em três níveis compatíveis com uma ampla faixa de valores séricos (2,0, 4,0 e 8,0 g/dL), preparados em tampão PBS 0,1 mol/L pH 7,4 utilizando um método colorimétrico baseado no corante BCG comercialmente disponível.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DOENÇAS RENAIIS

A função renal pode ser afetada por diversas doenças de qualquer parte do organismo. Com base na área do rim primariamente afetada, podemos classificar como doença glomerular, tubular ou intersticial (STRASINGER; DI LORENZO, 2009), sendo aguda ou crônica, levando em consideração o tempo no qual as lesões ocorrem (BURTIS; BRUNS, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). É extremamente importante estabelecer o diagnóstico, tratamento e prognóstico dessas enfermidades (MOTTA, 2009).

A doença renal aguda refere-se à redução súbita da função dos rins, causando distúrbios no equilíbrio hidroeletrólítico e ácido-base, devido principalmente a diminuição da TFG. É uma doença muito comum em unidades de terapia intensiva, acometendo aproximadamente 7% de todos os pacientes internados (DENNEN; DOUGLAS; ANDERSON, 2010). Já a DRC é a perda permanente da função renal e reconhecida como um problema global de saúde pública (MARINHO et al., 2017), atingindo 10% da população mundial (BRASIL, 2015). Para avaliação da cronicidade da doença, é analisada a TFG em conjunto com marcadores renais, como a creatinina sérica e a albumina urinária. Se a TFG encontrada for inferior a 60 mL/min/1,73 m² por mais de três meses, a DRC é confirmada (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013). Sendo uma organização global sem fins lucrativos que desenvolve e implementa diretrizes de práticas clínicas baseadas em evidências em doenças renais (KDIGO, 2020), o KDIGO apresenta diversos guias relacionados com essas enfermidades. Entre eles, podemos mencionar os de avaliação e manuseio da DRC na prática clínica, com recomendações a respeito dessa doença. Nesse guia, destaca-se a utilização da creatinina sérica para se estimar a TFG como melhor método diagnóstico, classificação e acompanhamento da progressão da DRC e o uso da equação *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI), juntamente com a mensuração da albumina urinária, obtendo-se um prognóstico de desenvolvimento desta doença (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013). A Figura 1 traz a relação entre a TFG e a albuminúria no prognóstico da DRC. Observa-se que à medida que a TFG vai diminuindo e o nível de albumina na urina aumentando, os quadrantes variam da cor verde (risco baixo), para amarelo (risco médio), laranja (risco alto) e por fim, vermelho (risco muito alto de desenvolvimento da DRC).

Figura 1 – Prognóstico da DRC utilizando a TFG e albuminúria.

Prognóstico de DRC por categorias de TFG e albuminúria: KDIGO 2012				Categorias de albuminúria persistente		
				Descrição e variação		
				A1	A2	A3
				Normal à leve aumento <30 mg/g <3mg/mmol	Aumento moderado 30-300 mg/g 3-300 mg/mmol	Aumento severo >300 mg/g >30 mg/mmol
Categorias de TFG (mL/min/1,73 m ²) Descrição e variação	G1	Normal ou alta	≥90			
	G2	Levemente diminuída	60-89			
	G3a	Leve a moderadamente diminuída	45-59			
	G3b	Moderada a severamente diminuída	30-44			
	G4	Severamente diminuída	15-29			
	G5	Insuficiência renal	<15			

Fonte: Adaptação de National Kidney Foundation (2013).

Estudos também demonstram que o aumento da perda de albumina na urina precede a DRD (KICONCO; RUGERA; KIWANUKA, 2019; TUTTLE et al., 2014) e a pré-eclâmpsia (JENSEN et al., 2010; MISHRA et al., 2017). A DRD é uma doença que acomete os rins, incluindo outros fatores, pela formação de produtos finais de glicação avançada (AGES) (FUKAMI et al., 2008; YUAN; SUN; SUN, 2017), que são produzidos intensamente em indivíduos com hiperglicemia crônica (BURTIS; BRUNS, 2016; THOMAS, 2011). De acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira do Diabetes (2019), a DRD é uma complicação crônica do DM atingindo entre 30 e 50% do total de pacientes portadores, que segundo a Organização Mundial da Saúde (2021) são aproximadamente 422 milhões. Há uma predição que a DRD tornar-se-á a sétima causa de morte do mundo até o ano de 2030 (ROSHAN; STANTON, 2013). Da porcentagem mencionada, em aproximadamente um quinto observa-se a redução isolada da TFG, fenótipo da doença renal não albuminúrica (SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019). Indivíduos com níveis altos de glicose por tempo prolongado em conjunto com outros fatores, como tabagismo, obesidade e hipertensão arterial, podem apresentar alto risco de desenvolvimento de DRD, causando lesões nos rins e até a falência dos mesmos (LIGA INTERDISCIPLINAR DE DIABETES, 2017). A Associação Americana do Diabetes (ADA) e a Sociedade Brasileira do Diabetes (SBD) recomendam a TFG estimada juntamente com a albuminúria para avaliação da DRD

(AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2018; SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES, 2019). Em um estudo realizado no Hospital Regional de Referência de Mbarara (Uganda), a prevalência de microalbuminúria em pacientes diabéticos foi de 22,9%. Os autores consideraram esse valor significativo, podendo evoluir para macroalbuminúria e suas complicações associadas, sendo necessário o acompanhamento dos níveis de glicose sanguínea, creatinina e ácido úrico nesses pacientes, mesmo na ausência da diminuição da TFG (KICONCO; RUGERA; KIWANUKA, 2019). Já distúrbios hipertensivos na gravidez são comuns e responsáveis por morbidade e mortalidade significativa no feto, no recém-nascido e na mãe (SALAKO et al., 2003), sendo um deles, a pré-eclâmpsia, que afeta de 3 a 5% das gestações e é diagnosticada, além da presença da hipertensão, pela proteinúria (MOL et al., 2016), que se apresenta como não seletiva devido ao aumento da permeabilidade tubular (ACOG, 2019). Nesses casos não fisiológicos, a proteína mais abundante encontrada na urina é a albumina (TOTO, 2004). Mishra et al. (2017) realizaram um estudo com o objetivo de estabelecer se a razão albumina/creatinina (RAC) urinária medida entre 20 e 28 semanas de gestação poderia prever pré-eclâmpsia subsequente em gestantes assintomáticas e concluíram que a patologia mencionada foi prevista bem antes do início das manifestações clínicas com alta sensibilidade (87,5%) e especificidade (96,3%). Portanto, a RAC urinária poderia ser usada como uma boa ferramenta de triagem para prever a pré-eclâmpsia no início da gravidez.

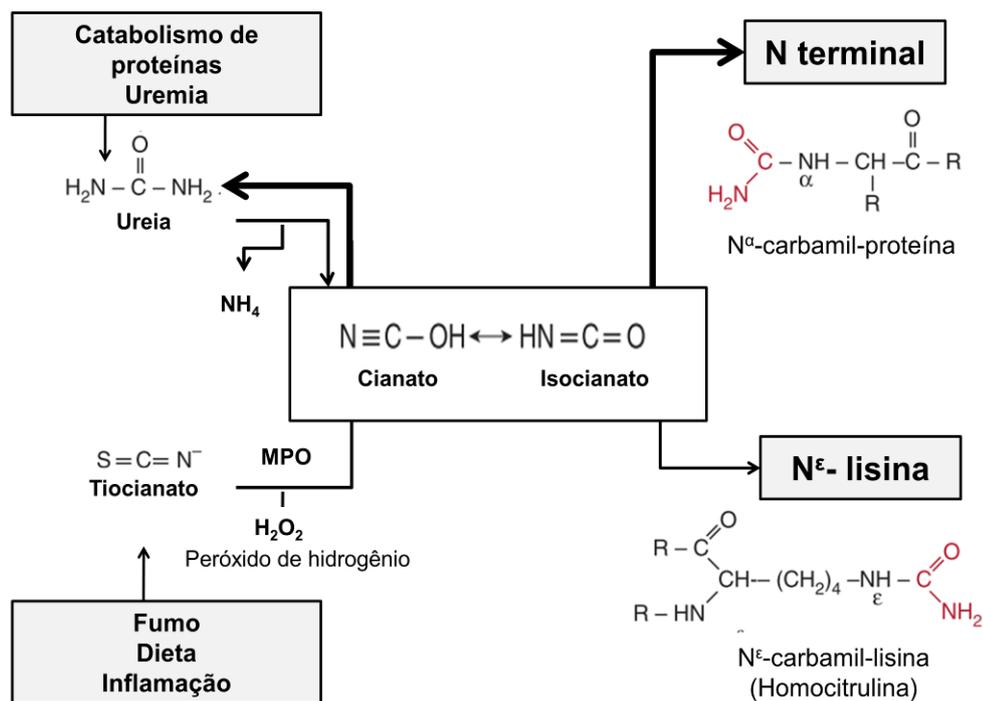
À medida que a DRC progride, ocorre o declínio da função renal levando ao acúmulo de resíduos metabólicos, como a ureia, nos tecidos e no sangue (KHAN; BHAT, 2019). Os níveis de isocianato, embora baixos *in vivo*, estão em equilíbrio com a ureia e, portanto, aumentam em doenças renais crônicas e em estágio terminal, favorecendo a carbamilação de proteínas (VERBRUGGE; TANG; HAZEN, 2015).

4.2 CARBAMILAÇÃO DE PROTEÍNAS

A carbamilação de proteínas é uma modificação pós-traducional não enzimática que pode causar mudanças nas propriedades e funções das mesmas (KHAN; BHAT, 2019), estando envolvida no processo patogênico de diversas doenças, como a DRC, doenças cardiovasculares, catarata e artrite reumatoide (AR). Trata-se de uma ligação na qual o cianato se une a moléculas contendo grupamentos amina ou tiol primários formando grupos carbamil (SHI et al., 2014), acelerando o envelhecimento molecular (NICOLAS et al., 2018). A ureia, resíduo tóxico do catabolismo proteico (BERG et al., 2013), se dissocia espontaneamente em

amônia e cianato, estando esse último em equilíbrio com o isocianato (DELANGHE et al., 2017b), processo que é dependente do pH e da temperatura. O isocianato é produzido por duas reações: (I) a desaminação da ureia e (II) pela oxidação do tiocianato através da enzima mieloperoxidase (MPO), causada pela inflamação ou através de fatores ambientais (DELANGHE et al., 2017c), destacando a dieta e o fumo (VERBRUGGE; TANG; HAZEN, 2015). Se a ligação com o isocianato ocorrer na porção N terminal das proteínas ou aminoácidos livres há a formação de N^α-carbamil-proteína. Já se a ligação ocorrer no grupo N^ε da lisina gera N^ε-carbamil-lisina, também denominada homocitrulina (BADAR; ARIF; ALAM, 2018; VERBRUGGE; TANG; HAZEN, 2015). Todo este processo descrito está ilustrado na Figura 2.

Figura 2 – Caminhos para a formação de proteínas carbamiladas *in vivo*.



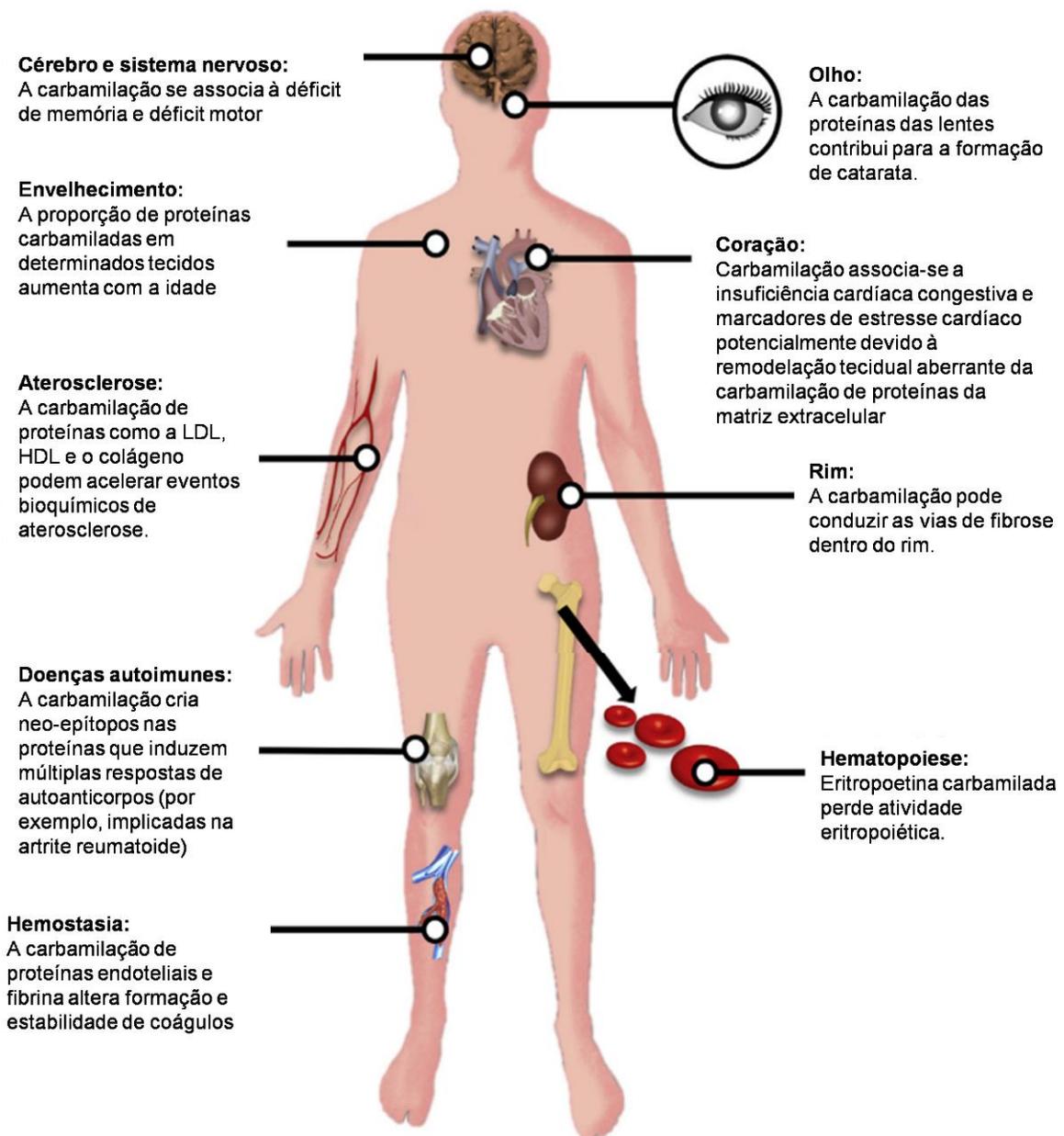
Fonte: Adaptação de Verbrugge, Tang e Hazen (2015).

Em um estudo de Claxton et al. (2013), os autores concluíram que a carbamilação também poderia ocorrer endogenamente no rim. No entanto, não estaria restrita apenas à medula renal, como se pensava, já que apresenta maior quantidade de ureia. Paralelo ao

estudo, os autores também avaliaram o impacto da ingestão de água na carbamilação na medula interna, não encontrando diferença significativa (CLAXTON et al., 2013), apesar da água se associar a mudanças marcantes nos níveis de ureia tecidual na medula renal (ATHERTON; HAI; THOMAS, 1968 apud CLAXTON et al., 2013 p. 8).

Conforme descrito por Shi et al. (2014), a carbamilação pode trazer consequências a nível molecular, celular e sistêmico. No primeiro nível mencionado, os autores incluem a alteração na capacidade de polimerização, na sensibilidade as proteinases e na avidéz de ligação ao antígeno do anticorpo. No segundo, relatam que a exposição a altas concentrações de cianato é citotóxica e que níveis reduzidos já são suficientes para causar mudanças nas funções celulares, consequências essas que podem desencadear efeitos sistêmicos, como a neurotoxicidade e hepatotoxicidade. Como qualquer proteína é capaz de ser carbamilada, é um processo que envolve muitas patogenias e progressão de diversas doenças (KHAN; BHAT, 2019), como mostrado na Figura 3.

Figura 3 – Efeitos sistêmicos da carbamilação de proteínas.



Fonte: Adaptação de Long, Parada e Kalim (2018).

Processos inflamatórios também são capazes de favorecer a carbamilação através da formação de cianato mediada pela MPO, estando fortemente envolvidos na gênese de doenças cardiovasculares (KHAN; BHAT, 2019). A lipoproteína de alta densidade (HDL) apresenta diversas funções, entre elas, (a) o transporte reverso do colesterol; (b) a proteção da oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL), evento este considerado o principal na iniciação do desenvolvimento da aterosclerose; (c) a participação na ativação de fatores de coagulação; e

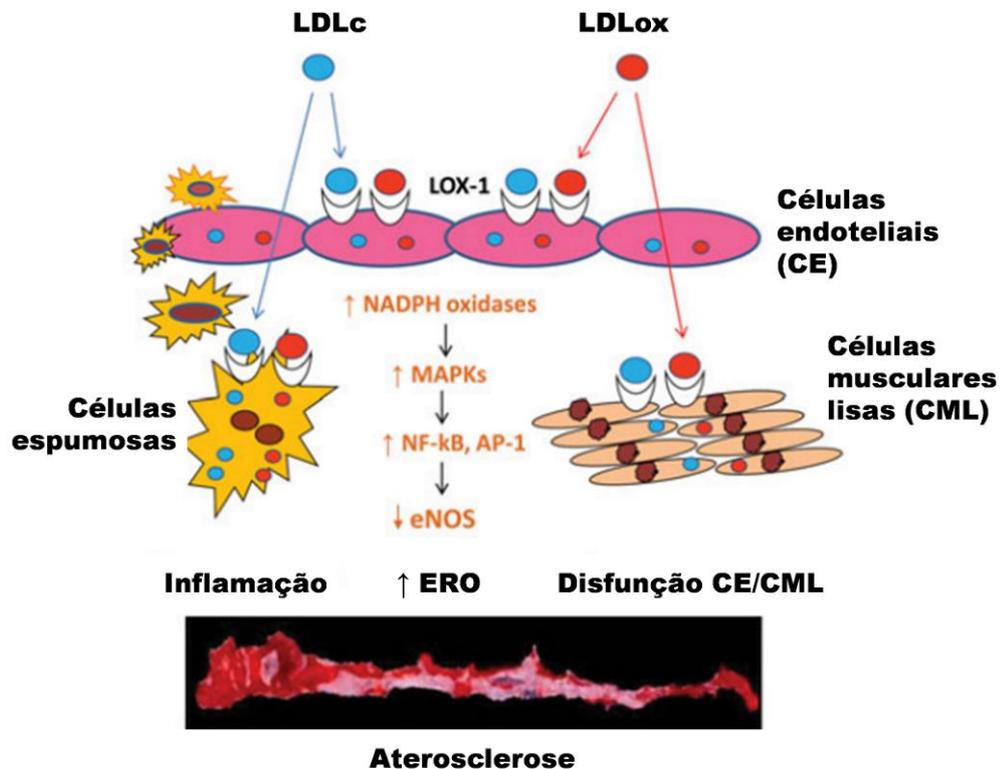
(d) a inibição da expressão de moléculas de adesão e ativação de leucócitos (LIMA; COUTO, 2006).

A carbamilação mínima da HDL prejudica significativamente (HOLZER et al., 2012):

- (I) a capacidade da mesma de ativar a lecitina-colesterol aciltransferase (LCAT), que esterifica o colesterol e está envolvida na maturação da própria HDL;
- (II) a atividade principal da paraoxonase, enzima anti-inflamatória associada à HDL;
- (III) a capacidade antioxidante da HDL (HOLZER et al., 2012).

A LDL em excesso se deposita nas paredes das artérias dando origem a um processo inflamatório que leva a necrose por falta de circulação sanguínea, chamada de infarto quando ocorre no músculo cardíaco, ou acidente vascular cerebral (AVC), quando ocorre no cérebro (QUINTO, 2016). Existem diferentes formas de LDL, como a LDL carbamilada (LDLc), a LDL glicada (LDLg) e a LDL oxidada (LDLox). A LDLc é gerada pela carbamilação da apolipoproteína B, componente da partícula de LDL (DELANGHE et al., 2017c). Em um estudo desenvolvido por Apostolov et al. (2005), o valor da LDLc encontrado foi três vezes superior em indivíduos urêmicos quando comparado ao grupo controle. A LDLc interage com o receptor LDL-1 oxidado do tipo lectina (LOX-1), levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) por oxidação de NADPH de origem endotelial (KHAN; BHAT, 2019). Com relação à LDLox, quanto mais oxidada for esta lipoproteína, mais aterogênica ela será, apresentando maior capacidade de causar doenças cardiovasculares (QUINTO, 2016). A Figura 4 mostra a ativação do receptor LOX-1 em células endoteliais pela interiorização da LDLc e da LDLox. Essas lipoproteínas especiais usam caminhos semelhantes, resultando na formação de células espumosas, proliferação de células musculares lisas (CML), inflamação e geração de ERO, que causam a quebra do óxido nítrico (NO). Logo, níveis reduzidos de HDL poderiam ser incapazes de eliminar o excesso de colesterol das paredes vasculares, contribuindo para o fenômeno inflamatório que caracteriza a patogênese da aterosclerose nas suas fases iniciais (LIMA; COUTO, 2006).

Figura 4 – Ativação do receptor LOX-1 em células endoteliais por LDLc e LDLox.



Legenda: eNOS – óxido nítrico sintase endotelial; MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno; NF-kB – fator nuclear).

Fonte: Adaptação de Mehta e Basnakian (2014).

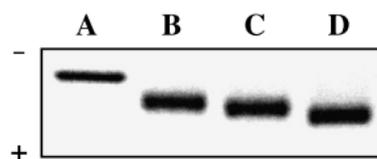
Na década de 1970, acreditava-se que a hemoglobina S (HbS) carbamilada apresentava maior afinidade ao oxigênio, quando comparada a HbS não carbamilada. Logo, pacientes com anemia falciforme passaram a ser tratados com cianato/ureia. Entretanto, esses pacientes desenvolveram catarata, que foi associada diretamente ao tratamento anteposto. Estudos adicionais em mamíferos foram realizados e concluíram que as cristalinas, proteínas das lentes, formavam pontes dissulfeto intercadeias e agregados proteicos, tornando mais claro o motivo do desenvolvimento da catarata (KALIM et al., 2014; KHAN; BHAT, 2019).

Como já mencionada acima, a exposição a fatores ambientais, além de levar a carbamilação local de uma proteína, se junta a um processo inflamatório e desencadeia uma resposta imune humoral a essas proteínas carbamiladas em indivíduos geneticamente suscetíveis. Um evento secundário associado à inflamação nas articulações sinoviais resulta em carbamilação nestes tecidos, seguido pela ativação da resposta de autoanticorpos para proteínas citrulinadas, que são os biomarcadores mais específicos para a AR. Certos

complexos imunes formados aumentarão o processo inflamatório, resultando em artrite. A presença contínua de determinadas enzimas ativadas nas articulações inflamadas também pode levar a inativação funcional de proteínas da matriz extracelular e quimiocinas, contribuindo para a destruição do tecido. Os autoanticorpos produzidos também podem contribuir para o processo final, a AR, ativando diretamente os osteoclastos (PRUIJN, 2015).

As concentrações plasmáticas de isocianato, composto responsável pelo processo de carbamilação, são mencionadas em vários estudos como próxima de 140 nmol/L em indivíduos urêmicos (NILSSON et al., 1996; VERBRUGGE; TANG; HAZEN, 2015). No entanto, a concentração do composto estimada através da cinética de degradação da ureia é 1000 vezes superior ao encontrado, chegando a níveis em $\mu\text{mol/L}$. Esse valor reduzido encontrado pode estar relacionado à alta reatividade do composto pelos grupos amino das proteínas (KOSHIISHI; IMANARI, 1990; PIENIAŻEK; GWOŹDZIŃSKI, 2016) e ao curto tempo de meia-vida do mesmo (PIENIAŻEK; GWOŹDZIŃSKI, 2016). Conforme já apresentado na Figura 2, outra via que contribui para a formação do composto responsável pela carbamilação é a oxidação do tiocianato pela enzima MPO. É desconhecida ao certo a influência dessa via nos níveis de isocianato plasmático, mas sabe-se que é a principal via de carbamilação de lipoproteínas, sendo essa última responsável por aumento de placas ateroscleróticas (WANG et al., 2007). Para a indução do processo carbamilativo *in vitro*, vários estudos utilizam o KOCN (BADAR et al., 2019; DELANGHE et al., 2017b, 2019; JAISSEON et al., 2007; KOK et al., 2014). Para avaliar a carbamilação induzida da albumina por esse composto, Jaisseon et al. (2007) analisaram a mobilidade eletroforética da proteína mencionada após a incubação com 100 mmol/L de KOCN em diferentes tempos (1h, 2h e 6h) a 37°C (Figura 5).

Figura 5 – Influência da carbamilação na mobilidade eletroforética da albumina. 2 μg do controle (A) ou de albumina carbamilada por KOCN por 1h (B), 2h (C) e 6h (D) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (m/v).



Fonte: Jaisseon et al. (2007)

A diferença na mobilidade eletroforética aumentou com o tempo de carbamilação, ou seja, com o número de resíduos de lisina modificados (JAISSON et al., 2007). Os resíduos de lisina carregam uma carga positiva em pH fisiológico. Anexar um grupo $-\text{CONH}_2$ induz uma perda dessa carga positiva, levando a uma mudança no ponto isoelétrico. A albumina, que é carregada negativamente em pH fisiológico, migra durante a eletroforese em direção ao eletrodo positivo porque o fluxo eletro-osmótico supera a mobilidade eletroforética. No entanto, a eliminação dessa carga positiva associada à formação de ϵ -carbamil-lisina da homocitrulina aumenta a mobilidade eletroforética (DELANGHE et al., 2017b). Jaisson et al. (2007) também avaliaram a formação de resíduos de homocitrulina a partir de resíduos de lisina, conforme mostrado na Tabela 1. Esse processo foi dependente do tempo de incubação da proteína com KOCN 100 mmol/L. Após 6h, havia ainda 80,3 resíduos de lisina por 1000 resíduos de aminoácidos. Quando analisada a homocitrulina, havia formado 19 resíduos por 1000 de aminoácidos. A análise de aminoácidos foi realizada por cromatografia de troca catiônica após hidrólise ácida.

Tabela 1 – Conteúdo de homocitrulina da albumina carbamilada.

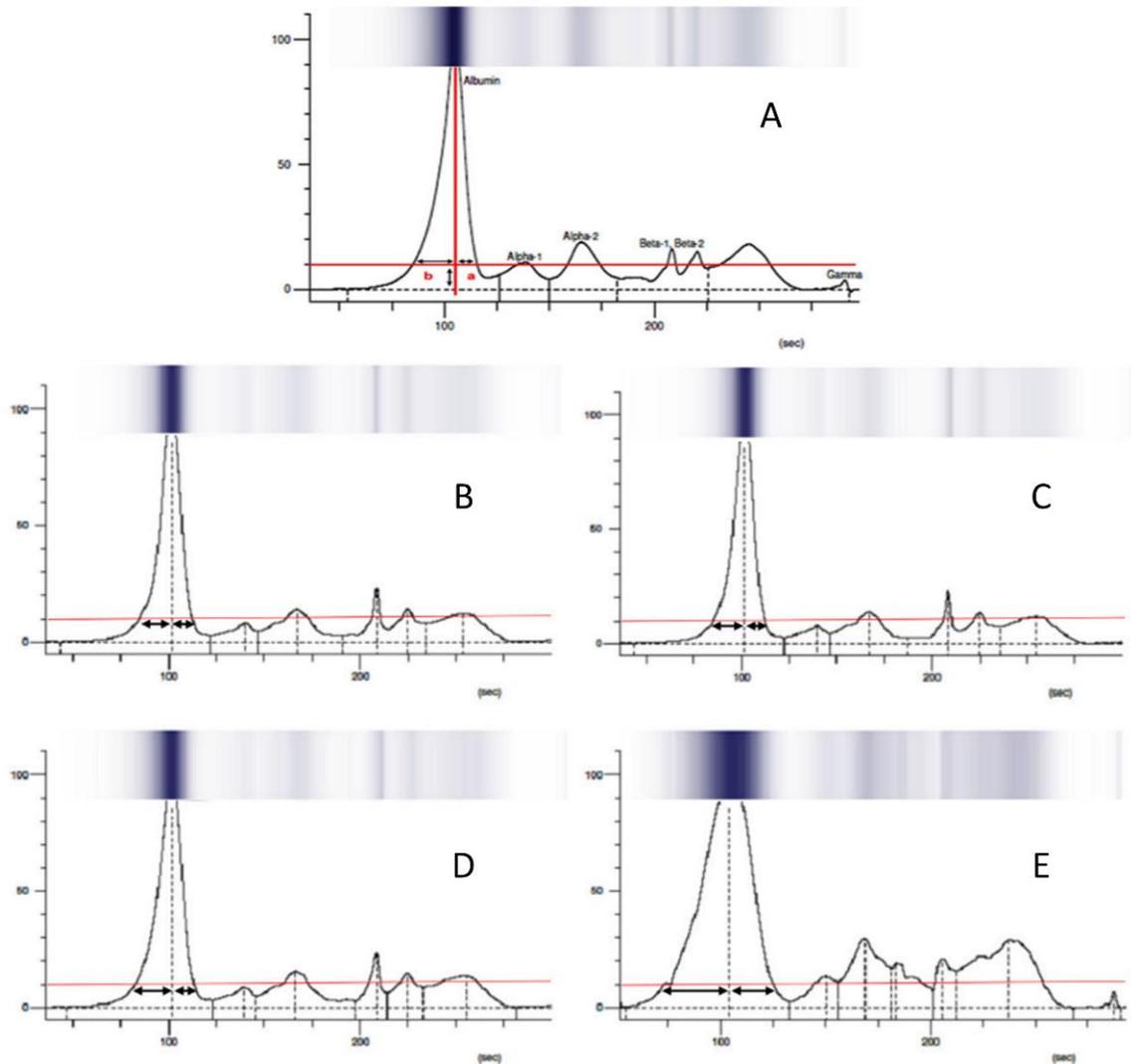
Tempo de incubação	Controle de albumina	Albumina carbamilada		
	-	1h	2h	6h
Homocitrulina	0	4,5 ± 0,3	8,1 ± 0,5	19,0 ± 1,0
Lisina	101,6 ± 1,0	95,4 ± 0,5	91,7 ± 0,7	80,3 ± 0,3

Os resultados são apresentados como média ± D.P. (n = 3) e expressos como número de resíduos de aminoácidos por 1000.

Fonte: Adaptação de Jaisson et al. (2007).

Já Delanghe et al. (2017b) demonstrou o uso da eletroforese capilar para a avaliação da albumina carbamilada em pacientes com DRC. A carbamilação foi induzida por KOCN nas concentrações de 1, 10 e 150 mmol/L. O intervalo de referência para o fator de simetria da albumina foi de 0,72-0,92. À medida que a concentração de KOCN foi aumentada, menor foi o fator de simetria encontrado. A Figura 6 mostra os espectros obtidos após a eletroforese capilar, incluindo o cálculo para o fator de simetria (1A). Observa-se o alargamento da frente do pico da albumina à proporção que a concentração do agente carbamilante aumenta (1C, 1D, 1E), diminuindo o fator de simetria em comparação à amostra controle (1B).

Figura 6 – Carbamilação da albumina sérica *in vitro*. (A) Espectro após eletroforese capilar mostrando o cálculo do fator de simetria, (B) Amostra controle (fator de simetria: 0,630), (C) Incubação com KOCN 1 mmol/L, (D) Incubação com KOCN 10 mmol/L e (E) Incubação com KOCN 150 mmol/L.

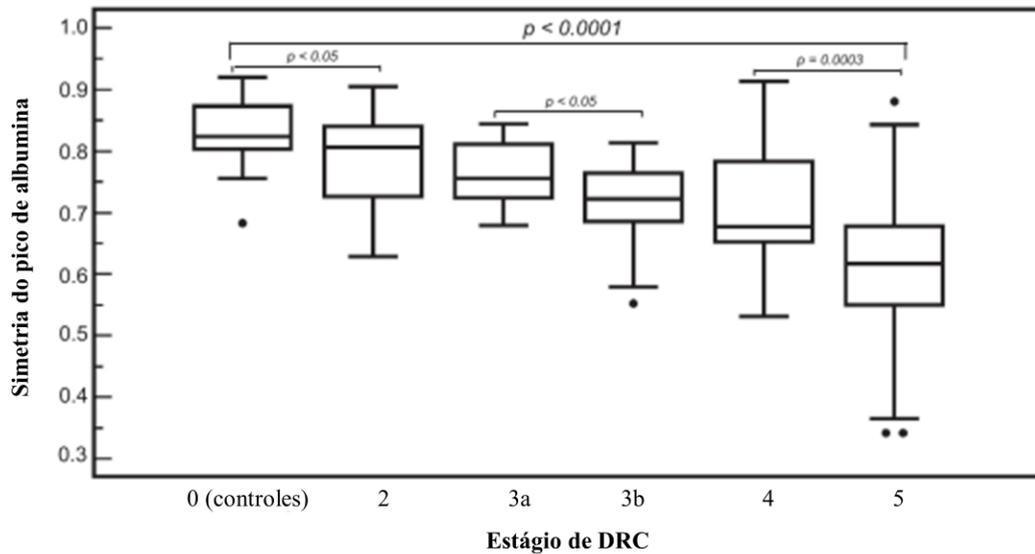


Legenda: O eixo x representa o tempo de migração em segundos, o eixo y foi normalizado no pico da albumina. L

Fonte: Adaptação de Delanghe et al. (2017b).

O uso de KOCN utilizado para indução de carbamilação *in vitro* apresentado na Figura 6 mostrou similaridade aos resultados encontrados em 239 amostras obtidas de indivíduos com DRC (Figura 7). O fator de simetria dos picos de albumina sérica foi diminuindo à proporção que o estágio de DRC tornava-se mais grave, apresentando diferença significativa ($p < 0,001$) (DELANGHE et al., 2017b).

Figura 7 – Fator de simetria da albumina sérica na amostra controle e em amostras em diferentes estágios de DRC.

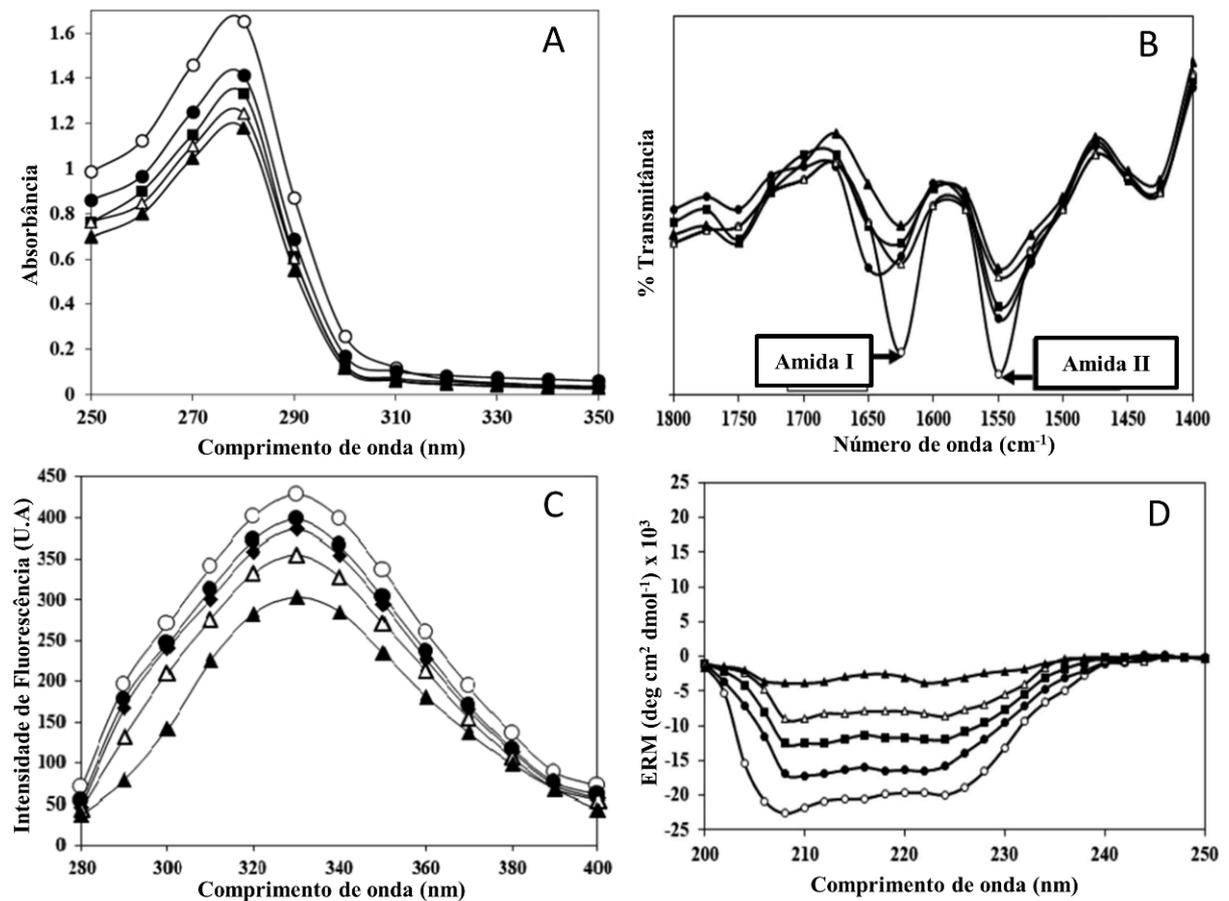


Fonte: Adaptação de Delanghe et al. (2017b).

Badar et al. (2019) realizaram a caracterização físico-química da albumina sérica carbamilada. Albumina sérica humana (ASH) na concentração de 0,045 mmol/L foi incubada, a 37°C por 6h, com KOCN nas proporções (ASH/KOCN) 1:555, 1:1111, 1:1666 e 1:2222. Os autores realizaram vários experimentos comuns em caracterizações de substâncias, como espectroscopias UV, de fluorescência, de infravermelho com transformada de Fourier e de dicroísmo circular (Figura 8). É possível ver na Figura 8A que a carbamilação causou vários graus de hipocromocidade em 280 nm. A albumina carbamilada mostrou diminuição de 14,52%, 19,30%, 25,90%, e 28,63% de hipocromocidade em diferentes razões molares de ASH:KOCN em comparação com a proteína nativa. Os espectros de infravermelho foram registrados na faixa de 1800 a 1400 cm^{-1} a fim de estudar as mudanças nas posições das bandas da amida I e da amida II. A diminuição nas intensidades das bandas das amidas mencionadas em amostras de albumina carbamilada em comparação à nativa está a favor de mudanças na estrutura secundária na proteína causada pela carbamilação (Figura 8B). Na Figura 8C, a adição do grupo carbamil à molécula de ASH também influenciou as propriedades de aminoácidos adjacentes. Isso foi testado monitorando a intensidade de emissão de resíduos de triptofano na albumina nativa e na albumina carbamilada após excitação a 295 nm, produzindo a extinção na fluorescência que foi diretamente proporcional à concentração de KOCN. Os resultados sugeriram que os resíduos de triptofano contribuem

grandemente para a extinção da fluorescência intrínseca das albuminas séricas. O estudo de dicroísmo circular confirmou os resultados obtidos por infravermelho, sugerindo alterações na estrutura secundária da proteína carbamylada. A nativa exibiu dois picos, um em 208 e outro em 222 nm, o que é típico da proteína α -helicoidal. A albumina nativa continha 68,1% de α -hélice que diminuiu para 67,99%, 67,86%, 66,4% e 23,21%, à medida que as concentrações de KOCN foram aumentadas (Figura 8D).

Figura 8 – Caracterização físico-química da albumina carbamylada. (A) Espectro UV/VIS, (B) Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier, (C) Espectro de fluorescência e (D) Espectro de Dicroísmo Circular.



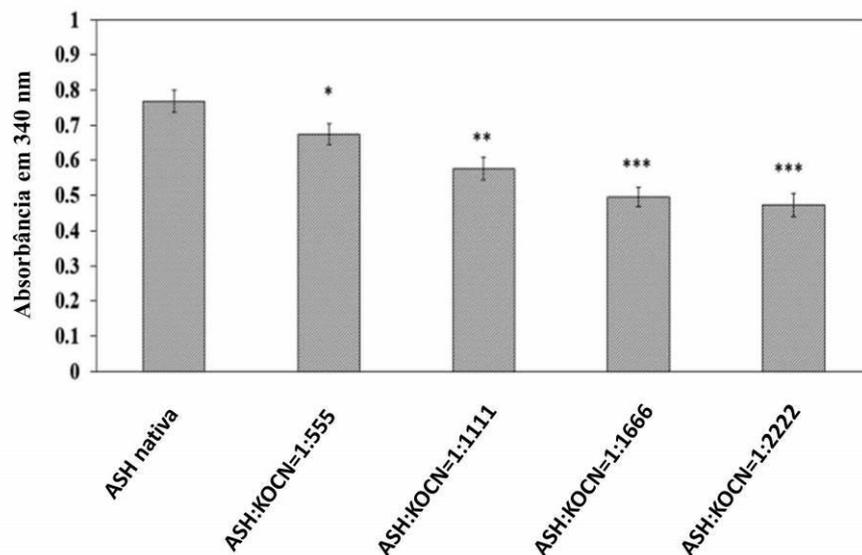
Legenda: Albumina nativa: (-o-); Razão Albumina humana: KOCN, 1:555 (-●-), 1:1111 (-■-), 1:1666 (-△-) e 1:2222 (-▲-).

U.A: unidade arbitrária. MRE: elipticidade residual média.

Fonte: Adaptação de Badar et al. (2019).

A porção carbamil liberada do KOCN pode reagir e ligar-se aos resíduos de lisina, propensos a carbamilação. Os resíduos disponíveis em amostras nativas e em amostras carbamiladas após a reação com o ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) são mostrados na Figura 9. Sugere-se que há envolvimento de resíduos de lisina pelo grupo carbamil, pois se verificou que um total de 41,17% dos resíduos de lisina estava carbamilados na razão molar de 1:2222 de ASH:KOCN.

Figura 9 – Estimativa de lisina pelo reagente TNBS em amostras de ASH nativa e albumina carbamilada.



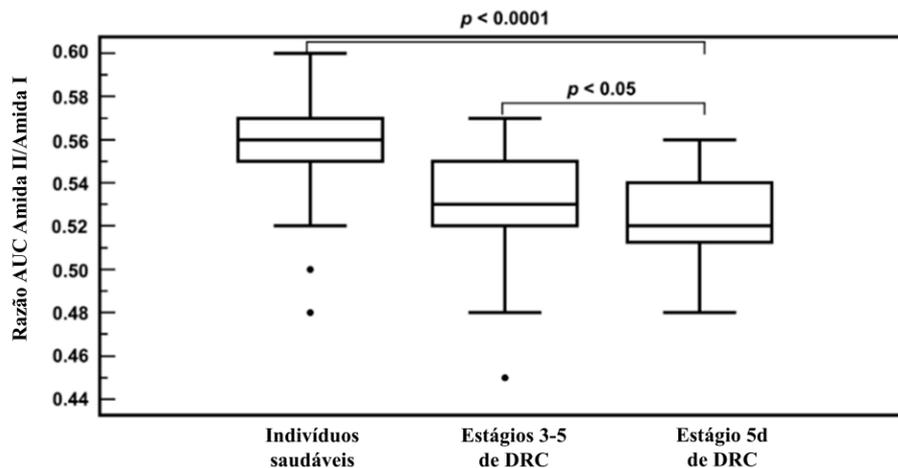
Cada barra representa a média \pm DP de 3 ensaios independentes (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ e *** $p < 0,0005$ são significativamente diferentes da ASH nativa).

Fonte: Adaptação de Badar et al. (2019).

Em um recente estudo realizado por Delanghe et al. (2019) foi avaliada a carbamilação de lipoproteínas não HDL pela adição de concentrações de KOCN em nível de mmol/L (20 a 100 mmol/L) a amostras de soro de pacientes considerados saudáveis. A ocorrência da carbamilação foi demonstrada por eletroforese em gel de agarose, apresentando um aumento progressivo da mobilidade eletroforética das lipoproteínas à proporção do aumento da concentração do agente carbamilante em questão. Os autores também avaliaram amostras de indivíduos em diferentes estágios de DRC por infravermelho com transformada de Fourier utilizando refletância total atenuada. Observou-se um pequeno aumento da banda da amida I,

já mencionada por Badar et al. (2019). Além disso, os resultados mostraram uma diminuição da relação área sob a curva (AUC) da banda da amida II/amida I com o aumento das concentrações de KOCN. Conforme mostrado na Figura 10, houve uma diferença significativa quando comparada a relação citada acima entre os grupos de indivíduos saudáveis com os pacientes em diferentes estágios de DRC e pacientes em hemodiálise (estágio 5d de DRC) ($p < 0,0001$). Os dois últimos grupos também apresentaram diferença significativa entre si ($p < 0,05$). Além disso, os autores encontraram uma correlação negativa entre a relação AUC amida II/amida I mencionada com a concentração de ureia sérica.

Figura 10 – Razão AUC amida II/amida I entre os diferentes grupos.



Fonte: Adaptação de Delanghe et al. (2019).

Berg et al. (2013) avaliaram a carbamilação da albumina sérica como fator de risco em pacientes com insuficiência renal relatando que a ureia promovia predominantemente a carbamilação na lisina-549 na molécula desta proteína. A proporção de albumina sérica carbamilada correlacionou-se com a ureia sanguínea média e foi duas vezes maior em pacientes com doença renal terminal quando comparada com indivíduos não urêmicos. Pacientes que apresentam essa enfermidade não produzem urina, levando ao acúmulo constante de concentrações crescentes de ureia no sangue. A hemodiálise intermitente (HdI) ou transplante de rim são as opções de tratamento. No entanto, a HdI substitui apenas 10% da função renal normal permanecendo sobrecarga crônica de ureia.

A carbamilação das proteínas costuma causar interferência nos métodos de mensuração das mesmas. Dolscheid-Pommerich et al. (2015) avaliaram o efeito da carbamilação sobre três métodos de doseamento de HbA_{1c} em pacientes com doença renal. 407 amostras de sangue total com EDTA de pacientes da nefrologia foram coletadas e divididas em três categorias: não diabéticos, pré-diabéticos e diabéticos. A hemoglobina carbamilaada foi avaliada em 203 espécimes pela determinação do nitrogênio sanguíneo proveniente da ureia, sendo os pacientes subdivididos em <80 mg/dL e >80 mg/dL. A fração A_{1c} da Hb foi mensurada por CLAE, eletroforese capilar e ensaio imunoturbidimétrico. Em 14 amostras, os métodos diferiram quanto ao diagnóstico de DM e pré-diabetes, enquanto 59 amostras discrepavam no diagnóstico de pré-diabetes e não diabetes. No grupo de níveis séricos de nitrogênio elevados (>80 mg/dL), a determinação de HbA_{1c} foi significativamente maior nos três métodos. No entanto, a comparação entre os métodos dentro de cada grupo resultou em valores semelhantes. Os autores concluíram que a carbamilação teve uma influência fraca sobre os métodos testados, mas que deveria ser considerada e, se necessário, corrigida. Nicolas et al. (2018) analisaram os potenciais efeitos competitivos *in vitro* e em condições de reprodução da DRC e/ou DM *in vivo*. Os autores concluíram que a carbamilação compete com a glicação *in vivo*, especialmente em condições de alta glicação, sugerindo cautela na avaliação dos marcadores clássicos do controle glicêmico em pacientes diabéticos com DRC. Em um estudo desenvolvido por Kok et al. (2014), o impacto da carbamilação *in vitro* de albumina em amostras de soro utilizando KOCN em diferentes concentrações (mmol/L, μmol/L e nmol/L) foi demonstrado utilizando uma única concentração de albumina (7,0 g/dL), acima do valor plasmático considerado normal. Os resultados mostraram uma interferência significativa nos métodos colorimétricos baseados em corantes da classe das sulfoneftaleínas, como o BCG e o púrpura de bromocresol (BCP), assim como no método imunonefelométrico. O efeito da carbamilação afetou os métodos em diferentes proporções, sendo o BCP o mais afetado nas três concentrações de KOCN testadas.

Conforme mencionado por Yadav et al. (2021), a albumina é a principal proteína carbamilaada pelos altos níveis de ureia no sangue. Esse processo reduz a habilidade da mesma de se ligar aos ligantes em até 67%, avaliada por um ensaio fluorimétrico (DENGLER; ROHERTZ-VAUPEL; DENGLER, 1992).

4.3 ALBUMINA

A albumina é uma proteína globular pequena, não glicosilada, com peso molecular de 66,4 kDa, formada por 585 aminoácidos (BURTIS; BRUNS, 2016) e 17 pontes dissulfeto, responsáveis pela conformação nativa da albumina sérica humana (PARIS et al., 2012), possuindo estrutura helicoidal e considerada flexibilidade (KUMAR; BANERJEE, 2017). É a proteína plasmática mais abundante no sangue, sintetizada pelas células do parênquima hepático chegando a níveis superiores a 60% (MOTTA, 2009). Apresenta a taxa de síntese controlada pela pressão osmótica coloidal (POC) e pela ingestão de proteínas, sendo afetada por citocinas inflamatórias. Suas principais funções são a manutenção da POC e o transporte de substâncias, como ácidos graxos livres, fosfolipídios, íons metálicos, aminoácidos, hormônios, bilirrubina e drogas (BURTIS; BRUNS, 2016; MOTTA, 2009), podendo determinar a proporção de fármaco livre disponível no plasma (MOTTA, 2009). Níveis elevados de albumina no plasma são raros, geralmente ligados à desidratação e não tem importância clínica. Já concentrações plasmáticas reduzidas estão presentes em diversas situações, entre elas, a excreção da mesma na urina, conhecida como albuminúria (BURTIS; BRUNS, 2016). Os mecanismos subjacentes ao aumento desta excreção são complexos. A maior parte da passagem da albumina através da membrana glomerular é reabsorvida pelas células tubulares proximais, sendo eliminada somente uma pequena quantidade da proteína na urina (LEZAIC, 2015). Segundo Comper et al. (2004), a albumina filtrada pelos rins é bioquimicamente modificada por enzimas lisossômicas, resultando na excreção de albumina intacta e fragmentos derivados das mesmas, esses últimos influenciando a perda da imunorreatividade da forma intacta no fluido tubular, também ocorrendo destruição das pontes dissulfeto seguido da mudança conformacional molecular (COMPER; OSICKA, 2005). Osicka e Comper (2004) interpretaram a albumina imunoquimicamente não reativa como um composto de cadeias peptídicas, resultantes da digestão proteolítica limitada e unidas por ligações dissulfeto e ligação não covalente de cadeia interpeptídica, provavelmente formada na passagem renal. Porém, os autores ressaltam que não podem eliminar a possibilidade de também haver este tipo de moléculas em baixas concentrações no sangue.

4.4 ALBUMINÚRIA

Albuminúria é a presença de albumina na urina (BRUNZEL, 2018; LEZAIC, 2015; NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013), sendo quantificada preferencialmente em

amostras de urina de 24h, que é considerada o padrão-ouro (LAMBERS HEERSPINK et al., 2008; MCFARLANE, 2014; POLKINGHORNE, 2006). No entanto, amostras aleatórias de urina podem ser usadas quando a albumina é relacionada com a creatinina, recomendando-se a primeira da manhã (BURTIS; BRUNS, 2016). Em um estudo realizado por Lambers Heerspink et al. (2008) os autores compararam a utilização da RAC na primeira urina da manhã com a mensuração de albumina na urina de 24h, avaliando a predição de morbidade e mortalidade cardiovascular. Como conclusão, a RAC na primeira urina da manhã foi tão confiável quanto o tipo de urina considerado padrão-ouro para dosagem da proteína citada (LAMBERS HEERSPINK et al., 2008). Isso facilita a coleta e diminui possíveis erros comuns na obtenção da amostra de 24h, tornando-se mais conveniente ao paciente (BURTIS; BRUNS, 2016; MCFARLANE, 2014).

Em condições normais, a albumina é encontrada na matriz urinária em concentrações abaixo de 30 mg/24h conhecido como normoalbuminúria. Níveis entre 30 e 300 mg/24h são denominados como microalbuminúria. Concentrações acima das citadas são classificadas como macroalbuminúria (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013; REMUZZI; SCHIEPPATI; RUGGENENTI, 2002). Os valores citados são iguais quando utilizada a RAC, devendo ser apresentados em mg de albumina por grama de creatinina. As principais formas de expressar o resultado de albumina em amostras de urina estão resumidas na Tabela 2.

Tabela 2 – Valores de albuminúria expressos de diferentes formas, dependentes da amostra de urina utilizada.

	Amostra de 24h mg/24h	Amostra isolada de urina		
		Concentração de albumina urinária mg/L	RAC	
			mg/mmol	mg/g
Normoalbuminúria	< 30	< 20	< 3	< 30
Microalbuminúria	30 – 300	20 – 200	3 – 30	30 – 300
Macroalbuminúria	> 300	> 200	> 30	> 300

Fonte: Adaptação de National Kindey Foundation (2013); Zanella (2006).

Níveis elevados de albuminúria podem estar relacionados a uma variedade de distúrbios renais e vasculares (MCFARLANE, 2014) causando o aumento da permeabilidade

glomerular (MOTTA, 2009; TOTO, 2004), embora alguns fatores levem a albuminúria transitória, como insuficiência cardíaca descompensada, exercício vigoroso, febre, infecção do trato urinário, alterações posturais e apneia do sono (TOTO, 2004). Estudos prospectivos demonstraram que o aumento da perda de albumina na urina precede a DRD, a doença renal terminal e a retinopatia proliferativa em pacientes com DM tipo 1 (BURTIS; BRUNS, 2016), assim como a pré-eclâmpsia (JENSEN et al., 2010; MISHRA et al., 2017).

A quantificação da albumina urinária é feita por diversos métodos, como os imunológicos, CLAE, tiras reativas, entre outros (COMPER; OSICKA, 2005; KUMAR; BANERJEE, 2017). Apesar de ser um marcador de doenças nos rins, pacientes anteriormente considerados normoalbuminúricos com recente diagnóstico de microalbuminúria apresentaram alterações histopatológicas renais avançadas (THONGBOONKERD, 2011). Isso pode estar relacionado às limitações dos métodos baseados em imunoenaios, que detectam apenas albuminas imunorreativas (THONGBOONKERD, 2011), já que existem pelo menos 63 formas e/ou fragmentos de albumina na urina (CANDIANO et al., 2006). Além das formas imunorreativas, a CLAE quantifica as não reativas (MAGLIANO et al., 2007). Entretanto, mostra-se como uma técnica dispendiosa, demorada (MORELLI, 2003) e ausente na maioria dos laboratórios clínicos (HERMES et al., 2013).

4.5 MÉTODOS PARA QUANTIFICAÇÃO DE ALBUMINA

Geralmente, a quantificação da albumina em amostras de soro é realizada através de métodos colorimétricos, utilizando corantes da classe das sulfoneftaleínas, como o BCG (KOK et al., 2014). Ao interagir com o corante tamponado, a proteína faz com que ocorra um desvio nas absorções máximas, sendo a quantidade de albumina ligada ao corante proporcional ao teor da mesma na amostra (MOTTA, 2009). Entretanto, o método possui limite de detecção fotométrica de 0,013 g/dL (130 mg/L) (LABTEST DIAGNÓSTICA, 2013), bem acima do valor de albumina encontrado normalmente em amostras de urina (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2013).

Os principais métodos utilizados na clínica para determinação de albumina em amostras de urina são os imunológicos, como a imunoturbidimetria e imunonefelometria (MERRILL et al., 2016), baseados na ligação da proteína com um anticorpo específico (COMPER; OSICKA, 2005). No entanto, qualquer alteração na molécula pode subestimar os resultados, não ocorrendo a interação com o anticorpo (COMPER; OSICKA, 2005). Vários estudos, inclusive, denominam as albuminas que interagem com o anticorpo como

imunorreativas, e as demais como não reativas (CHAN; HEROLD, 2006; MARTÍNEZ et al., 2018; OSICKA; COMPER, 2004). Conforme já mencionado anteriormente por Yadav et al. (2021), essas modificações na molécula causam queda na capacidade de ligação com ligantes. Horikoshi et al. (2013) compararam a mensuração da albumina em amostras de urina por CLAE e imunoturbidimetria, encontrando resultados aproximadamente 20% superiores quando detectados por CLAE e relacionaram esta diferença com a falta de detecção das moléculas não reativas pelos métodos imunológicos. Citado como um método utilizado na quantificação de albumina em amostras de urina (KUMAR; BANERJEE, 2017), a CLAE por exclusão é um método no qual as moléculas migram em diferentes velocidades conforme o tamanho das mesmas através de uma coluna, com as moléculas menores penetrando nos poros presentes e permanecendo mais tempo no interior das referidas colunas (GIL, 2010). Além do método por exclusão de tamanho citado, Klapkova et al. (2016) desenvolveram um método por CLAE utilizando coluna de fase reversa em sistema de eluição por gradiente. Os autores concluíram que o método foi altamente específico e mais sensível que a imunoturbidimetria no doseamento da albumina em urina, não ocorrendo coeluição com outras proteínas comuns nessa matriz biológica, também testadas.

Seguindo os trabalhos com comparações entre os principais métodos, Delanghe et al. (2017) compararam o método imunonefelométrico com as tiras teste baseadas em corante após utilização de uma protease para tornar as moléculas de albumina não reativas. Os resultados foram aproximadamente 53% inferiores para o método imunológico quando comparados aos valores iniciais, não afetando significativamente os valores mensurados pelas tiras teste. Kumar e Banerjee (2017) mencionam que métodos baseados em corantes são populares desde os anos 1950 e com o passar dos anos, permitiram que a estimativa da albumina fosse precisa e rápida. Os autores citam alguns dos corantes utilizados ao longo desse tempo, como o próprio BCG, usado para o doseamento da albumina plasmática, o BCP, o azul de bromofenol, o azul de tetrabromofenol, o azul de *coomassie* brilhante, o DIDNTB, entre outros. Inclusive, há estudos que comparam corantes entre si e/ou com outros métodos na mensuração de albumina urinária (DELANGHE et al., 2017a; PUGIA et al., 1997, 1998, 1999). Ensaios imunoquímicos semiquantitativos baseados em tiras reagentes têm sido desenvolvidos para que indivíduos com risco de doença renal possam ser avaliados utilizando amostras de urina aleatória ou a primeira da manhã. As tiras reagentes *Micral-Test* (Roche Diagnostics[®], Indianápolis, EUA) utilizam um conjugado de enzima com anticorpo antialbumina humana marcado com ouro (STRASINGER; DI LORENZO, 2009), que aumenta a estabilidade e permite que a tira seja lida a qualquer momento de um a pelo menos

60 minutos (BURTIS; BRUNS, 2016). O conjugado enzimático reage com o substrato, produzindo cores que vão do branco ao vermelho. A cor é comparável com a tabela presente no frasco das tiras, com resultados variando de zero a 10 mg/dL (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). As tiras *Immunodip (Diagnostic Chemicals Limited[®]*, Oxford, Canadá) utilizam uma técnica imunocromatográfica. A albumina presente na urina se liga a partículas de látex azul revestidas com anticorpo antialbumina e migra pela fita. Partículas não ligadas não migram tão longe. Formam-se duas bandas: a superior, que representa partículas ligadas e a inferior, as não ligadas. A intensidade da cor é comparada com a tabela do fabricante (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). Já as tiras reagentes *Clinitek Microalbumin (Siemens Medical Solutions Diagnostics[®]*, Nova Iorque, EUA) utilizam um corante com elevada sensibilidade e especificidade para albumina (BRUNZEL, 2018; STRASINGER; DI LORENZO, 2009), podendo medir este analito em amostras de urina sem a interferência de outras proteínas (STRASINGER; DI LORENZO, 2009). Além de fornecer a quantificação de albumina, essas tiras mensuram simultaneamente a creatinina urinária, baseada no princípio da atividade pseudoperoxidásica do complexo cobre-creatinina (BRUNZEL, 2018). Assim, é possível comparar a excreção de albumina com a de creatinina, que é produzida e excretada em uma taxa constante para cada indivíduo, corrigindo estados de hidratação/desidratação do paciente. O resultado, então, pode ser expresso pela relação semiquantitativa albumina/creatinina. Contudo, a leitura dessas tiras é feita exclusivamente em equipamentos próprios do fabricante (STRASINGER; DI LORENZO, 2009).

5 ARTIGO CIENTÍFICO I – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO IMUNOTURBIDIMÉTRICA DA ALBUMINA URINÁRIA

A **METODOLOGIA**, os **RESULTADOS** e a **DISCUSSÃO** encontram-se descritos detalhadamente no artigo científico que foi publicado no formato “*Technical Note*” no periódico *Analytical Biochemistry* (classificação A3 no novo sistema de classificação da CAPES, apresentando Fator de Impacto (2021) de 3,365). As **REFERÊNCIAS** mencionadas ao final do artigo estão relacionadas apenas ao mesmo.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.114047>

Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0003269720305790>

Impact of albumin carbamylation on immunoturbidimetric measurement of urinary albumin

José Pedro Etchepare Cassol^a, Rogério Scolari^{a,b}, Rafael Noal Moresco^{a,*}

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

^bUniversity Hospital, Santa Maria, RS, Brazil

Subject category: Immunological procedures

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

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

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

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Abstract

Urinary albumin is one of the main markers used in clinical practice to assess kidney damage. It is usually measured in laboratories through immunological assays, but these assays may not detect molecules with conformational changes, such as carbamylated albumin/proteins. Therefore, this study aimed to investigate the impact of albumin carbamylation on the measurement of albuminuria by an immunoturbidimetric assay. The addition of the carbamylating agent to PBS buffer and urine pool promoted a lower quantification of albumin measured by the immunoturbidimetric method, indicating that this process may be responsible for an underestimation of the results in clinical practice.

Keywords: Albuminuria; Carbamylation; Interference; Immunoturbidimetry

1. Introduction

Albumin, the main plasma protein, is usually found at low concentrations in urine samples. Elevated levels may be related to a variety of renal and vascular disorders, such as chronic kidney disease (CKD) and diabetic kidney disease (DKD), that cause increased glomerular permeability [1]. CKD is recognized as a global public health problem and affects about 10% of the world population [2]. Currently, urinary albumin and serum creatinine are the main markers used, together with the estimated glomerular filtration rate, to assess the chronicity of this disease [1]. Also, previous studies have shown that urinary albumin excretion precedes DKD and end-stage renal disease [3], as well as preeclampsia [4].

The most commonly used methods in the clinic to measure albuminuria are immunological, such as immunoturbidimetry and immunonephelometry, which are based on the interaction of the protein with a specific antibody [5]. However, only intact albumin molecules are detected, so any structural change may end up deflating the results [6]. Previous studies mention that any conformational change in the protein can make it non-reactive, allowing detection only by methods such as size exclusion-high performance liquid chromatography (SEC-HPLC) [7], which are unavailable in most clinical laboratories [8]. In addition to this, other structural changes can also occur. One of them is carbamylation, a non-enzymatic and irreversible post-translational modification mediated by cyanate, a product of urea dissociation. Carbamylation may occur both in the blood and endogenously in the kidneys [9]. As renal function decreases, urea concentration increases, contributing significantly to the process of carbamylation. Carbamylation, being a common occurrence in CKD, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, and other disorders, also favors the development of cataracts [10]. However, there are no reports in the literature about the interference of carbamylation of albumin on its levels as measured by the immunoturbidimetric method in urine samples. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of *in vitro* carbamylation, using KOCN as a carbamylating agent, on the albumin concentrations measured by immunoturbidimetry.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Human albumin (Grifols[®], Barcelona, Spain) solutions were prepared in a phosphate-buffered saline (PBS) solution 0.1 mol/L, pH 7.4. Four random urine samples were obtained from healthy individuals who performed routine exams at the Clinical Analysis Laboratory at the University Hospital of Santa Maria, located in Santa Maria, RS, Brazil. These samples were mixed and centrifuged at $362 \times g$ for 5 min. The supernatant was used for assays. The study protocol was approved by the Local Research Ethics Committee (registration number 11559119.4.0000.5346).

2.2. *In vitro* carbamylation and laboratory analysis

In vitro carbamylation was induced by the use of potassium cyanate (KOCN) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) [11]. KOCN solutions were prepared in PBS (0.1 mol/L, pH 7.4) to obtain final concentrations of 20, 40, 80, 100, 200 and 400 mmol/L. In brief, 100 μ L of the albumin standard solution (2000 mg/L) was incubated with 100 μ L of PBS or KOCN at the mentioned final concentrations. Then, 800 μ L of urine or PBS were added to complete the total volume of 1000 μ L. All conditions were performed in quadruplicate. The samples were vortex-mixed and stored at 37°C for 48 hours. After the storage period, albumin concentrations were measured using a commercial immunoturbidimetric assay for urinary albumin (Wiener Laboratorios, Rosario, Argentina) on a BS380 automated analyzer (Mindray[®], Shenzhen, China). Additionally, the effect of *in vitro* carbamylation on the quantification of albumin was tested using a colorimetric assay. Albumin solution (10000 mg/L) was incubated with KOCN 2000 mmol/L, following the same procedure described above, with final concentrations of 1000 mg/L and 200 mmol/L, respectively. The samples were vortex-mixed and stored at 37°C for 48 hours. Albumin concentrations were measured using a colorimetric bromocresol green assay for serum albumin (Labtest Diagnostica, Lagoa Santa, Brazil) on a BS380 automated analyzer (Mindray[®], Shenzhen, China).

2.3. Statistics

Data were expressed as mean \pm standard deviation (SD) or percentages. The influence of the *in vitro* carbamylation on the albumin concentrations quantified by immunoturbidimetry assay was analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. The impact of the *in vitro* carbamylation on the albumin concentrations measured

by colorimetric assay was analyzed by the t-test. Values of $p < 0.05$ were considered statistically significant. The data were analyzed using the GraphPad Prism® software, version 6.00 for Windows (San Diego, CA, USA).

3. Results

The addition of increasing concentrations of KOCN promoted statistically significant changes in albumin concentrations measured by the immunoturbidimetric assay. For the albumin standard prepared in PBS buffer, there was a reduction of 9.7 to 24.0% in the albumin concentrations revealed by the increase in the used carbamylating agent concentration, as shown in Figure 1A. For the albumin standard added in the urine pool, there was a reduction of 2.9 to 23.4% in the albumin concentrations depicted by the increase in the used carbamylating agent concentration, as shown in Figure 1B. Changes in albumin concentrations were observed for both albumin prepared in PBS buffer, and for standard albumin added to the urine sample pool. The quantification of albumin by the colorimetric assay was also influenced by carbamylation, with a significant overestimation of the results, as shown in Table 1.

4. Discussion

The key result of the present study was that the addition of a well-established carbamylating agent to samples containing albumin promoted a significant underestimation in the concentrations of albumin measured by the immunoturbidimetric assay. Therefore, the carbamylation of albumin seems to significantly affect the quantification of this protein by immunoturbidimetric assay. To our knowledge, this is the first study that reports the effects of carbamylation on the measurement of albumin by the use of this method. Thus, the importance of the present study is to provide a better understanding of the effect of the conformational change of albumin, caused by carbamylation induced by KOCN, in its measurement by an immunoturbidimetric method, based on the interaction of the protein with a specific antibody. Normally, patients with kidney injury present uremia and eliminate large amounts of urea in their urine. As a non-enzymatic and irreversible reaction mediated by a product of urea dissociation, carbamylation is capable of causing changes both in the structural properties and the specific functions of proteins [10]. Interestingly, some patients with DKD are considered normoalbuminuric, but they present advanced renal lesions after a biopsy, possibly due to a lack of detection of non-reactive albumin molecules [12].

Further, corroborating our findings, a recent study compared the quantification of albuminuria using the immunonephelometric method with the reflectance of dye-binding based test strips after using a protease, which makes the albumin molecules non-reactive. The results for the immunological method were approximately 53% lower when compared to the initial values [13]. In a relationship between the immunological method and the SEC-HPLC, results were found to be approximately 20% lower in the first, suggesting that the increase in non-reactive albumin indicates early kidney damage and the quantification of the protein by the second method could be used to detect the phase disease [14]. These latest results indicate that protein levels measured by immunoturbidimetry can normally be deflated, and may even be underestimated if the individual presents a disease, such as CKD or DKD that compromises kidney function. A decreased value of urinary albumin can lead to an erroneous diagnosis of the individual, especially those at the upper limit of normal values. Additionally, the present study reported an overestimation of the albumin concentration when quantification was performed by the colorimetric method based on the bromocresol green reaction. The interference of carbamylation on albumin measurement in serum samples using bromocresol green and immunonephelometry was previously reported, but these assays were only affected by non-physiological concentrations of KOCN [15].

Although there are no reports of carbamylation interference in the immunoturbidimetric measurement of albuminuria, previous studies mention the impact of this process on the methods of assaying other proteins, such as hemoglobin. Previous studies have also mentioned the impact of competition between carbamylation and glycation, which is normally present in individuals with diabetes mellitus and CKD, and question the reliability of HbA1c levels in CKD [16]. Carbamylation of hemoglobin had little influence on HPLC, capillary electrophoresis, and immunoturbidimetry. However, as kidney disease is the most common complication in patients with diabetes, this interference must be recognized and corrected, when necessary [17].

The *in vitro* conditions for carbamylation explored in this study may be higher than those that may occur physiologically. Thus, although the present study found a reduction in urinary albumin measured by immunoturbidimetry, this extreme carbamylation condition may not occur physiologically. However, it is challenging to determine the exact concentration for carbamylation in physiological and pathological conditions due to the high reactivity and the short half-life of the isocyanate [18].

5. Conclusion

The quantification of albumin by the immunoturbidimetric assay was affected by the addition of a carbamylating agent. Thus, carbamylation was responsible for an underestimation of the results of albumin measured by immunoturbidimetry. However, it was not possible to determine whether the conditions tested for carbamylation of albumin reflect the different pathophysiological conditions observed in clinical practice. Thus, the reduction found in urinary albumin concentrations may not be of clinical relevance. Additional studies to assess the effect of carbamylation on urinary albumin concentrations in different populations are strongly recommended.

Acknowledgements

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

Declaration of interest

None.

References

- [1] National Kidney Foundation, KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, *Kidney Int. Suppl.* 3 (2013) 1-150. <https://doi.org/10.1038/kisup.2012.76>.
- [2] Kidney Care UK, An estimated 1 in 10 people worldwide have chronic kidney disease, (2017). <https://www.kidneycareuk.org/news-and-campaigns/news/estimated-1-10-people-worldwide-have-chronic-kidney-disease/> (accessed July 10, 2020).
- [3] V. Lezaic, Albuminuria as a Biomarker of the Renal Disease, in: *Biomarkers Kidney Dis.*, 2015: pp. 1–18. <https://doi.org/10.1007/978-94-007-7743-9>.
- [4] V. V. Mishra, P.A. Goyal, R. Priyankur, S. Choudhary, R.S. Aggarwal, K. Gandhi, B. Vyas, S. Hokabaj, Evaluation of Spot Urinary Albumin–Creatinine Ratio as Screening Tool in Prediction of Pre-eclampsia in Early Pregnancy, *J. Obstet. Gynecol. India.* 67 (2017) 405–408. <https://doi.org/10.1007/s13224-016-0950-7>.
- [5] A.E. Merrill, J. Khan, J.A. Dickerson, D.T. Holmes, N.S. Harris, D.N. Greene,

- Method-to-method variability in urine albumin measurements, *Clin. Chim. Acta.* 460 (2016) 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2016.06.015>.
- [6] J.H. Contois, C. Hartigan, L. V. Rao, L.M. Snyder, M.J. Thompson, Analytical validation of an HPLC assay for urinary albumin, *Clin. Chim. Acta.* 367 (2006) 150–155. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.12.002>.
- [7] W.E. Owen, W.L. Roberts, Performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin, *Am. J. Clin. Pathol.* 124 (2005) 219–225. <https://doi.org/10.1309/F6WVK1525KLQGX4>.
- [8] C.L. Hermes, B.S. Hausen, M.B. Sangoi, T.C. Almeida, J.A.M. De Carvalho, P. Gomes, R.N. Moresco, An automated technique for the measurement of the plasma glutathione reductase activity and determination of reference limits for a healthy population, *Clin. Chem. Lab. Med.* 51 (2013) 31–33. <https://doi.org/10.1515/cclm-2012-0457>.
- [9] J.S. Claxton, P.C. Sandoval, G. Liu, C.L. Chou, J.D. Hoffert, M.A. Knepper, Endogenous carbamylation of renal medullary proteins, *PLoS One.* 8 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082655>.
- [10] S. Khan, A.A. Bhat, *Nonenzymatic Posttranslational Protein Modifications: Mechanism and Associated Disease Pathologies*, Elsevier Inc., 2019. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-811913-6.00010-2>.
- [11] S.E. Delanghe, S. De Bruyne, L. De Baene, W. Van Biesen, M.M. Speeckaert, J.R. Delanghe, Estimating the Level of Carbamoylated Plasma Non-High-Density Lipoproteins Using Infrared Spectroscopy, *J. Clin. Med.* 8 (2019) 774. <https://doi.org/10.3390/jcm8060774>.
- [12] V. Thongboonkerd, Study of diabetic nephropathy in the proteomic era, *Contrib. Nephrol.* 170 (2011) 172–183. <https://doi.org/10.1159/000325657>.
- [13] J.R. Delanghe, J. Himpe, N. De Cock, S. Delanghe, K. De Herde, V. Stove, M.M. Speeckaert, Sensitive albuminuria analysis using dye-binding based test strips, *Clin. Chim. Acta.* 471 (2017) 107–112. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2017.05.032>.
- [14] S. Horikoshi, M. Okuda, E. Nishimura, I. Ohsawa, Y. Suzuki, Y. Shimizu, C. Hamada, Y. Tomino, Usefulness of HPLC assay for early detection of microalbuminuria in chronic kidney disease, *J. Clin. Lab. Anal.* 27 (2013) 333–338. <https://doi.org/10.1002/jcla.21608>.
- [15] M.B. Kok, F.P. Tegelaers, B. van Dam, J.L. van Rijn, J. van Pelt, Carbamylation of

- albumin is a cause for discrepancies between albumin assays, *Clin. Chim. Acta.* 434 (2014) 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.03.035>.
- [16] C. Nicolas, S. Jaisson, L. Gorisse, F.J. Tessier, C. Niquet-Léridon, P. Jacolot, C. Pietrement, P. Gillery, Carbamylation is a competitor of glycation for protein modification in vivo, *Diabetes Metab.* 44 (2018) 160–167. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2017.05.006>.
- [17] R.C. Dolscheid-Pommerich, S. Kirchner, C. Weigel, L. Eichhorn, R. Conrad, B. Stoffel-Wagner, B. Zur, Impact of carbamylation on three different methods, HPLC, capillary electrophoresis and TINIA of measuring HbA1c levels in patients with kidney disease, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 108 (2015) 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2015.01.034>.
- [18] I. Koshiishi, T. Imanari, State Analysis of Endogenous Cyanate Ion in Human Plasma, *J. Pharmacobiodynamics.* 13 (1990) 254–258. <https://doi.org/10.1248/bpb1978.13.254>.

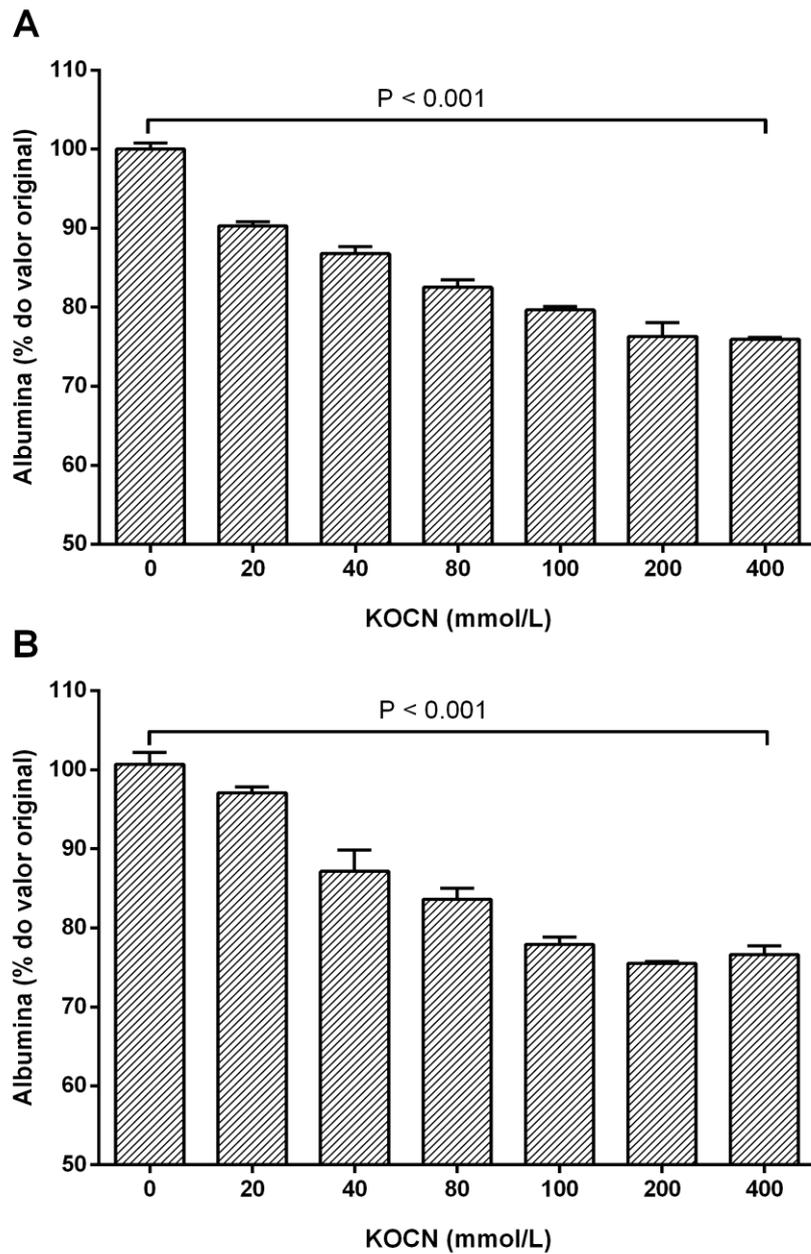


Figure 1. Albumin levels quantified by immunoturbidimetry after the carbamylation procedure using different concentrations of KOCN for albumin solution prepared in PBS (1A) and prepared in a urine pool (1B). The results (expressed as mean and SD) are presented as a percentage of the original value of urinary albumin before carbamylation.

Table 1. Albumin measurement using the colorimetric bromocresol green method after the carbamylation.

	PBS	KOCN 200 mmol/L	p
PBS + Albumin Standard	100 ± 0.2	164 ± 5	<0.001
Urine + Albumin Standard	100 ± 0.3	161 ± 6	<0.001

Data were expressed as mean ± SD and represent the percentage of albumin measured after the carbamylation compared with the original value.

6 ARTIGO CIENTÍFICO II – IMPACTO DA CARBAMILAÇÃO DA ALBUMINA SOBRE A MENSURAÇÃO COLORIMÉTRIA DA ALBUMINA

A **METODOLOGIA**, os **RESULTADOS** e a **DISCUSSÃO** encontram-se descritos detalhadamente no artigo científico que foi aceito para publicação no formato “*Letter to the editor*” no periódico *Clinical Laboratory* (classificação B1 no novo sistema classificatório da CAPES, apresentando Fator de Impacto (2021) de 1,138). As **REFERÊNCIAS** mencionadas ao final do artigo estão relacionadas apenas ao mesmo. O aceite do artigo científico pelo periódico é apresentado no **ANEXO A**.

LETTER TO THE EDITOR

Impact of albumin carbamylation on colorimetric measurement of albumin

Running title: Impact of carbamylation on measurement of albumin

José Pedro Etchepare Cassol¹, Rafael Noal Moresco^{1*}

¹Laboratory of Clinical Biochemistry, Department of Clinical and Toxicological Analysis, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

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

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

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

E-mail: rnmoresco@ufsm.br

Keywords: Albumin; Carbamylation; Interference.

Dear Editor,

Albumin, the main plasma protein, is a small, non-glycosylated globular protein that has several functions, including the maintenance of colloidal oncotic pressure and transport of various substances, including drugs. Several clinical situations can cause a decrease in plasma albumin concentrations, including the loss of protein in the urine, known as albuminuria [1]. The considerable presence of albumin in the urine is usually related to some pathologies, such as chronic kidney disease (CKD) [2]. As CKD progresses, renal function declines, leading to the accumulation of metabolic wastes, such as urea, in tissues and blood. Urea dissociates spontaneously into ammonia and cyanate, the latter presenting itself in equilibrium with isocyanate, the compound responsible for protein carbamylation, which is a non-enzymatic and irreversible post-translational modification. Isocyanate is also produced by oxidation of thiocyanate through the enzyme myeloperoxidase (MPO). This process is influenced by inflammation, diet, and environmental factors [3]. Plasma albumin is mainly measured by colorimetric methods based on dyes of the sulfonephthalein class, such as bromocresol green (BCG) and bromocresol purple (BCP) [4], which have a higher affinity for albumin compared to other proteins, and depend on the change in the absorption spectrum of the dyes after binding to them [1]. Previous studies have shown that albumin carbamylation can induce alterations in the quantification of the mentioned protein in several tested methods [4], including the immunoturbidimetric used to measure low concentration albumin in urine samples, which we have already evaluated [5]. However, in the present study, we investigated the influence of carbamylation induced by potassium cyanate (KOCN) *in vitro*, taking into account the biological concentrations of this protein found in plasma under normal conditions, in hypoalbuminemia and hyperalbuminemia, quantified by a colorimetric assay based on commercially available BCG dye.

Solutions of human albumin (Vialebex[®], Paris, France) were prepared to obtain final concentrations of 8.0 g/dL, 4.0 g/dL, and 2.0 g/dL in 0.1 mol/L phosphate buffer solution (PBS), pH 7.4. *In vitro* carbamylation was induced by the use of KOCN (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Different final concentrations of the carbamylating agent (20, 40, 80, 100, 200, and 400 mmol/L) were used, according to a previous study [5]. The solutions were prepared in 0.1 mol/L PBS and the pH was adjusted to 7.4. In brief, 300 μ L of albumin solution was incubated with 300 μ L of PBS or KOCN at the final concentrations mentioned. All experiments were performed in triplicates. The samples were vortex-mixed and stored at 37°C for 48 hours. After the storage period, the samples were again vortex-mixed and

albumin concentrations were measured using a commercially available BCG colorimetric assay to measure serum albumin (Quibasa, Belo Horizonte, Brazil) on a BS380 automated analyzer (Mindray[®], Shenzhen, China). Data are expressed as the mean \pm standard deviation. The impact of *in vitro* carbamylation on albumin concentrations, quantified by the colorimetric assay, was analyzed by one-way ANOVA. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Data were analyzed using GraphPad Prism[®] software (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

The addition of increasing concentrations of the carbamylating agent promoted significant changes in albumin levels measured by the BCG dye assay at the three protein concentrations tested. The average levels of albumin for each concentration of KOCN are listed in Table 1. As the concentration of KOCN used increases, the quantified albumin level decreases. At a concentration of 8.0 g/dL, there was a significant underestimation of the results between 13.56% and 27.11%. For 4.0 g/dL, there was also a significant reduction between 13.40% and 27.35%. As for the concentration of 2.0 g/dL, the decrease occurred between 20.10% and 24.74%.

The main finding of this study was that after adding the carbamylating agent to samples containing the human albumin standard, there was a significant underestimation of the concentrations of the protein quantified by the assay containing the BCG dye. Therefore, albumin carbamylation appears to significantly affect the measurement of albumin by a dye-based colorimetric assay, which is widely used in clinical practice. To our knowledge, this is the first study to evaluate carbamylation induced by three concentrations of human albumin, considering the plasma concentrations of the protein found in healthy individuals and associated pathologies. Moreover, this study complements a study developed and previously published by the group itself, which evaluated the influence of carbamylation on the measurement of albumin in urine samples using the immunoturbidimetric method [5]. Another study compared the impact of carbamylation using different methods, two of which were dye-based, using only a concentration of albumin (7.0 g/dL), which is not normally found in healthy individuals. Albumin levels were also underestimated as the carbamylating agent concentrations increased [4]. As for the concentrations of KOCN used, the most common pathway for cyanic acid formation is through the reversible dissociation of urea into ammonia and cyanate in aqueous solutions. The equilibrium shifts in favor of urea at a ratio of 100:1. However, the high reactivity of the compound allows it to quickly bind to proteins and other substrates, thus moving the equilibrium to dissociation [6]. In addition, the thiocyanate oxidation pathway by the MPO enzyme plays an important role in the development of

atherosclerosis after lipoprotein carbamylation [7], probably significantly contributing to the plasma levels of isocyanate. Our study showed the increasing interference caused by KOCN at the first concentration tested. Carbamylated albumin presents changes in its structure and functions, including the modification of binding with ligands, which could be attributed to the cause of the underestimation of the results found [8]. In conclusion, the quantification of albumin by a colorimetric method based on the BCG dye was significantly affected by the concentrations and experimental conditions tested, showing an underestimation of the results.

Acknowledgments

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

Declaration of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. C.A. Burtis, D.E. Bruns, Tietz - Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, 7a ed., Elsevier, Philadelphia, 2015 (ISBN: 978-1-4557-4165-6).
2. National Kidney Foundation, KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease, *Kidney Int. Suppl.* 3 (2013) 1–150 https://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/KDIGO_2012_CKD_GL.pdf.
3. F.H. Verbrugge, W.H.W. Tang, S.L. Hazen, Protein carbamylation and cardiovascular disease, *Kidney Int.* 88 (2015) 474–478 (PMID: 26061545).
4. M.B. Kok, F.P.W. Tegelaers, B. van Dam, J.L.M.L. van Rijn, J. van Pelt, Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays, *Clin. Chim. Acta.* 434 (2014) 6–10 (PMID: 24709253).
5. J.P.E. Cassol, R. Scolari, R.N. Moresco, Impact of albumin carbamylation on immunoturbidimetric measurement of urinary albumin, *Anal. Biochem.* 614 (2021) 114047 (PMID: 33249000).
6. S. Jaisson, C. Pietrement, P. Gillery, Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers, in: *Adv. Clin. Chem.*, 2018: pp. 1–38 (PMID: 29478512).
7. Z. Wang, S.J. Nicholls, E.R. Rodriguez et al., Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis, *Nat. Med.* 13 (2007) 1176–1184

(PMID: 17828273).

8. A. Badar, Z. Arif, S.N. Islam, K. Alam, Physicochemical characterization of carbamylated human serum albumin: an *in vitro* study, RSC Adv. 9 (2019) 36508–36516 <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2019/ra/c9ra05875c>.

Table 1. Albumin concentrations measured by BCG dye-based colorimetric assay after the carbamylation process using different concentrations of KOCN.

		0 mmol/L	20 mmol/L	40 mmol/L	80 mmol/L	100 mmol/L	200 mmol/L	400 mmol/L	p
Human	8.0 g/dL	7.01 ± 0.05	6.06 ± 0.07	5.89 ± 0.02	5.77 ± 0.03	5.55 ± 0.40	5.38 ± 0.06	5.11 ± 0.01	<0.001
albumin	4.0 g/dL	3.73 ± 0.03	3.23 ± 0.04	3.00 ± 0.02	2.96 ± 0.06	2.93 ± 0.07	2.77 ± 0.02	2.71 ± 0.02	<0.001
standard	2.0 g/dL	1.94 ± 0.01	1.55 ± 0.06	1.58 ± 0.03	1.53 ± 0.03	1.53 ± 0.03	1.44 ± 0.02	1.46 ± 0.02	<0.001

Results are expressed in mean ± standard deviation.

7 DISCUSSÃO

O principal achado do presente estudo foi que a adição de KOCN, um agente já bem caracterizado por estudos anteriores como indutor de carbamilação *in vitro* (BADAR et al., 2019; DELANGHE et al., 2017b; JAISSON et al., 2007), às amostras contendo albumina promoveu uma subestimação nos níveis do analito mensurado por método colorimétrico e imunoturbidimétrico. Sendo uma modificação pós-traducional não enzimática irreversível, a carbamilação é capaz de causar alterações conformacionais nas moléculas (KHAN; BHAT, 2019) levando a uma subestimação significativa nas concentrações de proteínas. Isso pode afetar a interpretação de resultados, principalmente em indivíduos que se encontram nos limites de valores de referência entre o normal e alterado. Logo, a importância do presente estudo é fornecer um melhor entendimento do efeito da alteração conformacional da albumina, causada pela carbamilação induzida por diferentes concentrações de KOCN, sobre os métodos mais utilizados na clínica para quantificação da proteína em questão no plasma e na urina.

Estudos anteriores já mencionaram a interferência de mudanças conformacionais da albumina nos principais métodos de quantificação. Horikoshi et al. (2013) realizaram uma comparação da mensuração de microalbuminúria entre um método imunológico e a CLAE por exclusão de tamanho. Os resultados encontrados foram aproximadamente 20% inferiores no primeiro, sugerindo a não detecção das chamadas moléculas não imunorreativas (HORIKOSHI et al., 2013). Isso pode resultar em uma menor eficácia na identificação de uma lesão renal. Como exemplo, alguns pacientes com DRD considerados anteriormente normoalbuminúricos com recente diagnóstico para microalbuminúria apresentaram lesões renais avançadas após biópsia (THONGBOONKERD, 2011). Um estudo desenvolvido por Delanghe et al. (2017a), já citado nesse trabalho, comparou a quantificação de albuminúria usando um método imunológico baseado no princípio da nefelometria com outra técnica utilizando a refletância de tiras teste a base de ligação com corantes. A amostra foi submetida a um tratamento com uma protease para tornar as moléculas proteicas não reativas. Com isso, os resultados do teste imunonefelométrico foram inferiores quando relacionados aos valores iniciais. Outro experimento realizado pelos autores no mesmo estudo foi a comparação da medição de moléculas de albumina modificadas pela glicação (isoladas de amostras com macroalbuminúria) e pela carbamilação (induzida com KOCN *in vitro*) entre os dois métodos já mencionados. Os autores concluíram que as moléculas modificadas interagem diferentemente com o corante das tiras reativas quando comparadas com a albumina nativa

(DELANGHE et al., 2017a), semelhante ao que ocorreu em nosso estudo com o corante BCG. À medida que as concentrações do agente carbamilante foram aumentadas, os valores mensurados de albumina pelo método colorimétrico foram subestimados, possivelmente pela diferença causada pelo processo carbamilativo na interação do corante com a proteína. Dengler, Robertz-Vaupel e Dengler (1992) avaliaram a capacidade de inibição da ligação da ASH com ligantes endógenos na presença de uremia, incluindo no estudo a carbamilação da proteína. Como conclusão, os autores mencionaram a diminuição na capacidade de ligação da ASH com ligantes fisiológicos acumulados em indivíduos que apresentaram insuficiência renal crônica, ocorrendo por inibição competitiva. Já a alteração conformacional causada pela carbamilação resultou em uma diminuição de 67% na capacidade de ligação da proteína em questão.

O método imunoturbidimétrico está baseado na interação da albumina com um anticorpo específico. Modificações na conformação da proteína são capazes de afetar essa ligação, levando a subestimação dos resultados (COMPER; OSICKA, 2005). Na avaliação do impacto da carbamilação da albumina sobre o método imunológico, nossos resultados mostraram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) nos níveis de albumina com o aumento da concentração de KOCN (Figura 1 – ARTIGO CIENTÍFICO I). A variação ocorreu entre 9,7 e 24,0% com a albumina preparada em PBS 0,1 mol/L pH 7,4 e entre 2,9 e 23,4% com a proteína preparada utilizando o pool de urina. Cabe mencionar que a concentração de albuminúria quantificada no pool de urina de indivíduos supostamente saudáveis foi de 1,3 mg/L e não houve significância estatística entre as concentrações mensuradas considerando a matriz de preparo.

A albumina, por ser a principal proteína presente no plasma, está intimamente ligada ao processo carbamilante (YADAV et al., 2021). Já foi relatada a interferência negativa da carbamilação na mensuração dessa proteína em amostras de soro em concentração não fisiológica (7,0 g/dL) usando um método colorimétrico baseado no corante BCG e imunonefelometria (KOK et al., 2014). Em nosso estudo, quando utilizada solução contendo 1000 mg/L de albumina, os níveis mensurados pelo método BCG apresentaram-se significativamente aumentados ($p < 0,001$) após incubação com KOCN (Table 1 – ARTIGO CIENTÍFICO I), estando em desacordo com a literatura. Isso pode estar ligado às limitações do kit comercial colorimétrico utilizado, que apresenta limite de detecção de 130 mg/L e linearidade de até 6,0 g/dL, não especificando o limite mínimo de quantificação. Logo, o ensaio não se apresentou adequado para avaliação do analito nessa concentração proteica com exatidão. No entanto, ao analisarmos a influência da carbamilação sobre a técnica

colorimétrica com concentrações da albumina dentro da normalidade plasmática (4,0 g/dL), incluindo também níveis de hipoalbuminemia (2,0 g/dL) e hiperalbuminemia (8,0 g/dL), os resultados encontrados foram outros, corroborando com os obtidos por Kok et al. (2014). Observa-se a subestimação dos níveis da proteína à proporção que as concentrações de KOCN foram aumentadas na tabela presente no ARTIGO CIENTÍFICO II. Ainda, percebe-se um perfil de decaimento semelhante entre as concentrações de 8,0 g/dL e 4,0 g/dL. Após a incubação com KOCN 20 mmol/L, houve uma subestimação de 13,56% e 13,41%, respectivamente. Já após a incubação com KOCN 400 mmol/L, a diminuição foi, respectivamente, de 27,11% e 27,35%. Para a concentração de 2,0 g/dL, o comportamento foi um pouco diferente. Apesar de apresentar subestimação, não ocorreu uma diminuição contínua dos resultados, podendo já ter certa influência das características do kit comercial na mensuração com exatidão citadas anteriormente. Mesmo assim, após aplicação estatística, os dados mostraram diminuição significativa nos níveis de albumina ($p < 0,001$) à proporção do aumento das concentrações de KOCN.

Níveis plasmáticos de cianato encontrados em indivíduos que apresentam uremia foram mensurados em concentrações nmol/L utilizando um método de separação cromatográfica com detecção fluorimétrica. O método é baseado na derivatização do cianato com ácido 2-aminobenzoico, levando a um produto fluorescente cíclico estável, o 2,4 (1H, 3H)-quinazolinediona (LUNDQUIST et al., 1993). Contudo, esse método foi desenvolvido na década de 90 (LUNDQUIST et al., 1993). Estudos posteriores relataram a alta reatividade do cianato pelo grupamento amino proteico seguido do seu baixo tempo de meia-vida (PIENIAŻEK; GWOŹDZIŃSKI, 2016), sendo então de difícil mensuração. Conforme já mencionado, a via mais comum para a formação do cianato é através da dissociação reversível da ureia em amônia e cianato, em soluções aquosas. O equilíbrio está em favor da ureia na proporção de 100:1. Todavia, com base nos fatores de reatividade e tempo de meia-vida já mencionados, o equilíbrio é deslocado para a dissociação (JAISSON; PIETREMENT; GILLERY, 2018). Além da degradação da ureia, o cianato também pode ser oriundo do fumo, da dieta e de processos inflamatórios através da via da oxidação do tiocianato pela enzima MPO. Essa via é citada na literatura como grande influenciadora no desenvolvimento da aterosclerose através da carbamilação da HDL e LDL. Em um estudo desenvolvido por Delanghe et al. (2019), os autores avaliaram a carbamilação de lipoproteínas não HDL *in vitro* por espectroscopia de infravermelho utilizando KOCN em diferentes concentrações mmol/L. Embora não haja relatos de impacto do processo na dosagem imunoturbidimétrica de albuminúria, estudos anteriores mencionam o impacto nas técnicas de mensuração de outras

proteínas, como a hemoglobina. Dolscheid-Pommerich et al. (2015) compararam o efeito da carbamilação em três diferentes métodos para mensuração da HbA_{1c}, sendo um deles baseado em imunensaio de inibição turbidimétrica. As amostras foram divididas em dois grupos conforme o nível de nitrogênio ureico no sangue (NUS): <80 e >80 mg/dL. Após aplicação estatística, não houve diferença significativa entre os métodos dentro de cada grupo, ocorrendo aumento significativo nas concentrações de HbA_{1c} no segundo grupo. Quanto ao diagnóstico, em 14 amostras os resultados diferiram quanto à classificação DM x pré-diabetes, enquanto em 59 amostras, os métodos discordaram quanto à avaliação de pré-diabetes x não diabetes, reforçando a importância do impacto da carbamilação no diagnóstico clínico. Sendo uma proteína frequentemente avaliada para monitoramento do DM, a hemoglobina também é alvo do processo de glicação. Por conseguinte, Nicolas et al. (2018) avaliaram a competição desse processo com o de carbamilação, concluindo que as proteínas poderiam ser disputadas pelos dois processos mencionados *in vivo*, especialmente em condições de alta glicação. Portanto, indivíduos que apresentam DM e DRC devem apresentar cuidado na avaliação da HbA_{1c}. Esse cuidado também é relatado por Desmons et al. (2017), que utilizaram a técnica de CLAE por troca catiônica para avaliação da HbA_{1c}. Os autores avaliaram a carbamilação *in vitro* utilizando KOCN em diferentes concentrações. Ao final, foi criada uma árvore de decisão baseada no tempo de retenção, a forma do pico e o nível de ureia no sangue, diferenciando a interferência causada pela hemoglobina lábil (ureia dentro do valor de referência) da carbamilada (ureia acima do valor de referência). Os autores concluíram que um impacto maior que 2% na avaliação da HbA_{1c}, na presença de uremia, é limitante ao método utilizado, devendo a análise prosseguir por um método imunológico.

8 CONCLUSÃO

➤ A albumina preparada em PBS 0,1 mol/L com pH ajustado para 7,4 teve sua quantificação por ensaio imunoturbidimétrico afetada pela adição de um agente carbamilante. A interferência desse processo no ensaio já ocorreu na primeira concentração de KOCN usada (20 mmol/L), que foi aumentada conjuntamente com a concentração do agente carbamilante. A albumina preparada em pool de urina obtida de quatro indivíduos supostamente saudáveis também teve sua mensuração por ensaio imunoturbidimétrico afetada pela adição de KOCN em todas as concentrações testadas. Não houve diferença significativa nos resultados quando comparado o preparo da solução de albumina em PBS ou pool de urina. Essa subestimação no ensaio imunoturbidimétrico ocorreu possivelmente pela modificação conformacional da molécula proteica causada pela carbamilação, afetando a ligação da proteína com o anticorpo específico.

➤ A mensuração da albumina por ensaio colorimétrico baseado no corante BCG também foi afetada pela adição de KOCN. Assim como ocorreu no método imunoturbidimétrico, os níveis de albumina nas três concentrações testadas foram subestimados à medida que foram aumentadas as concentrações do agente carbamilante. Essa diminuição nos resultados quando mensurados pelo ensaio colorimétrico ocorreu possivelmente pela alteração, provocada pela carbamilação, na ligação da albumina pelo corante BCG. Quando avaliado o processo em questão sobre concentração de albumina de 1000 mg/L, concentração altamente superior encontrada normalmente em amostras de urina e inferior às concentrações séricas, o ensaio colorimétrico BCG apresentou uma superestimação dos resultados, podendo estar relacionado possivelmente às limitações do método utilizado para baixas concentrações, pois não é informado nas especificações do kit comercial utilizado o limite mínimo de quantificação para avaliação das amostras com exatidão.

➤ Apesar dos resultados mostrarem uma interferência negativa significativa da carbamilação induzida *in vitro* por KOCN nas diferentes condições testadas, tanto no método imunoturbidimétrico quanto no colorimétrico, não é possível determinar se os mesmos refletem as diferentes condições fisiopatológicas observadas na prática clínica. No entanto, sugere-se um cuidado na interpretação clínica em indivíduos que apresentem DRC e DRD, devido principalmente à competição dos processos de carbamilação e glicação.

REFERÊNCIAS

- ACOG. Practice Bulletin - Gestational Hypertension and Preeclampsia. **Obstetrics and gynecology**, v. 133, n. 1, p. e1–e25, 2019.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes—2018. **The Journal of Clinical And Applied Research and Education**, v. 41, n. 1, p. 1–159, 2018.
- APOSTOLOV, E. O. et al. Quantification of carbamylated LDL in human sera by a new sandwich ELISA. **Clinical Chemistry**, v. 51, n. 4, p. 719–728, 2005.
- BADAR, A. et al. Physicochemical characterization of carbamylated human serum albumin: an *in vitro* study. **RSC Advances**, v. 9, n. 63, p. 36508–36516, 2019.
- BADAR, A.; ARIF, Z.; ALAM, K. Role of Carbamylated Biomolecules in Human Diseases. **IUBMB Life**, v. 70, n. 4, p. 267–275, 2018.
- BERG, A. H. et al. Carbamylation of Serum Albumin as a Risk Factor for Mortality in Patients with Kidney Failure. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 175, p. 1–22, 2013.
- BRASIL. **Dia mundial do rim**. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2015/03/doenca-renal-cronica-atinge-10-da-populacao-mundial>>. Acesso em: 23 ago. 2021.
- BRUNZEL, N. A. **Fundamentals of urine and body fluid analysis**. 4th. ed. St. Louis: Elsevier, 2018.
- BURTIS, C. A.; BRUNS, D. E. **Tietz - Fundamentos de Química Clínica e Diagnóstico Molecular**. 7a. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- CANDIANO, G. et al. Repetitive fragmentation products of albumin and alpha1-antitrypsin in glomerular diseases associated with nephrotic syndrome. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, v. 17, n. 11, p. 3139–48, 2006.
- CHAN, O. T. M.; HEROLD, D. A. Chip Electrophoresis as a method for quantifying total microalbuminuria. **Clinical Chemistry**, v. 52, n. 11, p. 2141–2146, 2006.
- CLAXTON, J. S. et al. Endogenous carbamylation of renal medullary proteins. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–9, 2013.
- COMPER, W. D. et al. Earlier detection of microalbuminuria in diabetic patients using a new urinary albumin assay. **Kidney International**, v. 65, n. 5, p. 1850–1855, 2004.
- COMPER, W. D.; OSICKA, T. M. Detection of urinary albumin. **Advances in Chronic Kidney Disease**, v. 12, n. 2, p. 170–176, 2005.
- DELANGHE, J. R. et al. Sensitive albuminuria analysis using dye-binding based test strips. **Clinica Chimica Acta**, v. 471, n. May, p. 107–112, 2017a.
- DELANGHE, S. et al. Quantification of carbamylated albumin in serum based on capillary

electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 38, n. 17, p. 2135–2140, 2017b.

DELANGHE, S. et al. Mechanisms and consequences of carbamylation. **Nature Reviews Nephrology**, v. 13, n. 9, p. 580–593, 2017c.

DELANGHE, S. E. et al. Estimating the Level of Carbamoylated Plasma Non-High-Density Lipoproteins Using Infrared Spectroscopy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8, n. 774, p. 1–9, 2019.

DENGLER, T. J.; ROHERTZ-VAUPEL, G. M.; DENGLER, H. J. Albumin binding in uraemia: quantitative assessment of inhibition by endogenous ligands and carbamylation of albumin. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 491–499, 1992.

DENNEN, P.; DOUGLAS, I. S.; ANDERSON, R. Acute kidney injury in the intensive care unit: An update and primer for the intensivist. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 1, p. 261–275, 2010.

DESMONS, A. et al. Labile glycated haemoglobin and carbamylated haemoglobin are still critical points for HbA1c measurement. **Biochemia Medica**, v. 27, n. 2, p. 378–386, 2017.

DOLSCHEID-POMMERICH, R. C. et al. Impact of carbamylation on three different methods, HPLC, capillary electrophoresis and TINIA of measuring HbA1c levels in patients with kidney disease. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 108, n. 1, p. 15–22, 2015.

FUKAMI, K. et al. Role of AGEs in Diabetic Nephropathy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n. 10, p. 946–952, 2008.

GIL, E. S. **Controle Físico-Químico de Qualidade de Medicamentos**. 3a. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2010.

HERMES, C. L. et al. An automated technique for the measurement of the plasma glutathione reductase activity and determination of reference limits for a healthy population. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 51, n. 2, p. 31–33, 2013.

HOLZER, M. et al. Myeloperoxidase-derived chlorinating species induce protein carbamylation through decomposition of thiocyanate and urea: Novel pathways generating dysfunctional high-density lipoprotein. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 17, n. 8, p. 1043–1052, 2012.

HORIKOSHI, S. et al. Usefulness of HPLC assay for early detection of microalbuminuria in chronic kidney disease. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 27, n. 4, p. 333–338, 2013.

JAISSON, S. et al. Carbamylated albumin is a potent inhibitor of polymorphonuclear neutrophil respiratory burst. **FEBS Letters**, v. 581, n. 7, p. 1509–1513, 2007.

JAISSON, S.; PIETREMENT, C.; GILLERY, P. Protein Carbamylation: Chemistry, Pathophysiological Involvement, and Biomarkers. In: **Advances in Clinical Chemistry**. Cambridge: Elsevier, 2018. v. 84, p. 1–38.

JENSEN, D. M. et al. Microalbuminuria, preeclampsia, and preterm delivery in pregnant women with type 1 diabetes: Results from a nationwide Danish study. **Diabetes Care**, v. 33, n. 1, p. 90–94, 2010.

KALIM, S. et al. Protein Carbamylation in kidney disease: Pathogenesis and clinical implications. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 64, n. 5, p. 793–803, 2014.

KDIGO. **Global Science. Local Change**. Disponível em: <<https://kdigo.org/>>. Acesso em: 7 ago. 2021.

KHAN, S.; BHAT, A. A. **Nonenzymatic Posttranslational Protein Modifications: Mechanism and Associated Disease Pathologies**. Cambridge: Academic Press, 2019.

KICONCO, R.; RUGERA, S. P.; KIWANUKA, G. N. Microalbuminuria and Traditional Serum Biomarkers of Nephropathy among Diabetic Patients at Mbarara Regional Referral Hospital in South Western Uganda. **Journal of Diabetes Research**, v. 2019, 2019.

KLAPKOVA, E. et al. Determination of Urine Albumin by New Simple High-Performance Liquid Chromatography Method. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 00, p. 1–6, 2016.

KOK, M. B. et al. Carbamylation of albumin is a cause for discrepancies between albumin assays. **Clinica Chimica Acta**, v. 434, p. 6–10, 2014.

KOSHIISHI, I.; IMANARI, T. State analysis of endogenous cyanate ion in human plasma. **Journal of Pharmacobio-Dynamics**, v. 13, n. 4, p. 254–258, 1990.

KUMAR, D.; BANERJEE, D. Methods of albumin estimation in clinical biochemistry: Past, present, and future. **Clinica Chimica Acta**, v. 469, n. August 2016, p. 150–160, 2017.

LABTEST DIAGNÓSTICA. **Albumina - Instruções de uso**. Disponível em: <https://labtest.com.br/wp-content/uploads/2016/09/Ref_19_RevOutubro2013_Ref260117_Port.pdf>. Acesso em: 11 jun. 2021.

LAMBERS HEERSPINK, H. J. et al. Albuminuria assessed from first-morning-void urine samples versus 24-hour urine collections as a predictor of cardiovascular morbidity and mortality. **American Journal of Epidemiology**, v. 168, n. 8, p. 897–905, 2008.

LEZAIC, V. Albuminuria as a Biomarker of the Renal Disease. In: PATEL, V. B. (Ed.). **Biomarkers in Kidney Disease**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2015. p. 1–18.

LIGA INTERDISCIPLINAR DE DIABETES. **Doença Renal do Diabetes**. Disponível em: <<https://www.ufrgs.br/lidia-diabetes/2017/08/20/doenca-renal-do-diabetes/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.

LIMA, E. S.; COUTO, R. D. Estrutura, metabolismo e funções fisiológicas da lipoproteína de alta densidade. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 169–178, 2006.

- LONG, J.; VELA PARADA, X.; KALIM, S. Protein Carbamylation in Chronic Kidney Disease and Dialysis. In: **Advances in Clinical Chemistry**. Amsterdã: Elsevier, 2018. v. 87, p. 37–67.
- LUNDQUIST, P. et al. Fluorometric Determination of Cyanate in Plasma by Conversion to 2,4(1H,3H)-Quinazolinedione and Separation by High-Performance Liquid Chromatography. **Analytical Biochemistry**, v. 211, n. 1, p. 23–27, 1993.
- MAGLIANO, D. J. et al. HPLC-detected albuminuria predicts mortality. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 12, p. 3171–3176, 2007.
- MARINHO, A. W. G. B. et al. Prevalência de doença renal crônica em adultos no Brasil: revisão sistemática da literatura. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 379–388, 2017.
- MARTÍNEZ, F. et al. Immune-unreactive urinary albumin as a predictor of cardiovascular events : the Hortega Study. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v. 2018, p. 1–9, 2018.
- MCFARLANE, P. A. Testing for Albuminuria in 2014. **Canadian Journal of Diabetes**, v. 38, n. 5, p. 372–375, 2014.
- MEHTA, J. L.; BASNAKIAN, A. G. Interaction of carbamylated LDL with LOX-1 in the induction of endothelial dysfunction and atherosclerosis. **European Heart Journal**, v. 35, n. 43, p. 2996–2997, 2014.
- MERRILL, A. E. et al. Method-to-method variability in urine albumin measurements. **Clinica Chimica Acta**, v. 460, p. 114–119, 2016.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Biblioteca virtual em saúde. Insuficiência renal aguda**. Disponível em: <<http://bvsmis.saude.gov.br/dicas-em-saude/2082-insuficiencia-renal-aguda>>. Acesso em: 30 ago. 2021.
- MISHRA, V. V. et al. Evaluation of Spot Urinary Albumin–Creatinine Ratio as Screening Tool in Prediction of Pre-eclampsia in Early Pregnancy. **Journal of Obstetrics and Gynecology of India**, v. 67, n. 6, p. 405–408, 2017.
- MOL, B. W. J. et al. Pre-eclampsia. **The Lancet**, v. 387, n. 10022, p. 999–1011, 2016.
- MORELLI, B. Determination of binary mixtures of analgesic and spasmolytic drugs in pure and dosage forms by derivative spectrophotometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 33, n. 3, p. 423–433, 2003.
- MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para laboratório - Princípios e interpretações**. 5a. ed. Rio de Janeiro: MedBook, 2009.
- NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. **Kidney International Supplements**, v. 3, n. 1, p. 1–150, 2013.
- NICOLAS, C. et al. Carbamylation is a competitor of glycation for protein modification in vivo. **Diabetes and Metabolism**, v. 44, n. 2, p. 160–167, 2018.

NILSSON, L. et al. Plasma cyanate concentrations in chronic renal failure. **Clinical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 482–483, 1996.

OMS. **Diabetes**. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/diabetes#>>. Acesso em: 22 ago. 2021.

OSICKA, T. M.; COMPER, W. D. Characterization of Immunochemically Nonreactive Urinary Albumin. **Clinical Chemistry**, v. 2291, p. 2286–2291, 2004.

PARIS, G. et al. About the structural role of disulfide bridges in serum albumins: Evidence from protein simulated unfolding. **Biopolymers**, v. 97, n. 11, p. 889–898, 2012.

PIENIAŻEK, A.; GWOŹDZIŃSKI, K. Carbamylation of proteins-mechanism, causes and consequences. **Advances in Hygiene and Experimental Medicine**, v. 70, p. 514–521, 2016.

POLKINGHORNE, K. Detection and measurement of urinary protein. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 15, n. 6, p. 625–630, 2006.

PRUIJN, G. J. M. Citrullination and Carbamylation in the Pathophysiology of Rheumatoid Arthritis. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 1–5, 2015.

PUGIA, M. J. et al. Comparison of Urine Dipsticks with Quantitative Methods for Microalbuminuria. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 35, n. 9, p. 693–700, 1997.

PUGIA, M. J. et al. Comparison of Instrument-Read Dipsticks for Albumin and Creatinine in Urine With Visual Results and Quantitative Methods. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 12, p. 280–284, 1998.

PUGIA, M. J. et al. High-sensitivity dye binding assay for albumin in urine. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 13, n. 4, p. 180–187, 1999.

QUINTO, A. C. **Cientistas diferenciam LDL com maior potencial para dano à saúde**. Disponível em: <<https://jornal.usp.br/ciencias/ciencias-da-saude/cientistas-diferenciam-ldl-com-maior-potencial-para-dano-a-saude/>>. Acesso em: 14 ago. 2021.

REMUZZI, G.; SCHIEPPATI, A.; RUGGENENTI, P. Nephropathy in patients with type 2 diabetes. **N Engl J Med**, v. 346, n. 15, p. 1145–1151, 2002.

ROSHAN, B.; STANTON, R. C. A story of microalbuminuria and diabetic nephropathy. **Journal of Nephropathology**, v. 2, n. 4, p. 234–240, 2013.

SALAKO, B. L. et al. Microalbuminuria in pregnancy as a predictor of preeclampsia and eclampsia. **West African Journal of Medicine**, v. 22, n. 4, p. 295–300, 2003.

SHI, J. et al. Carbamylation and antibodies against carbamylated proteins in autoimmunity and other pathologies. **Autoimmunity Reviews**, v. 13, n. 3, p. 225–230, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DO DIABETES. Avaliação, prevenção e tratamento da doença renal do diabetes mellitus. In: **Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020**.

São Paulo: Clannad Editora Científica, 2019. p. 318–337.

STRASINGER, S. K.; DI LORENZO, M. S. **Urinálise e fluidos corporais**. 5a. ed. São Paulo: Livraria Médica Paulista, 2009.

THOMAS, M. C. Advanced Glycation End-Products. **Pathogenetic Mechanisms of Diabetic Nephropathy**, v. 170, p. 66–74, 2011.

THONGBOONKERD, V. Study of diabetic nephropathy in the proteomic era. **Contributions of Nephrology**, v. 170, p. 172–183, 2011.

TOTO, R. D. Microalbuminuria: definition, detection, and clinical significance. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 6, n. 11 Suppl 3, p. 2–7, 2004.

TUTTLE, K. R. et al. Diabetic kidney disease: A report from an ADA consensus conference. **Diabetes Care**, v. 37, n. 10, p. 2864–2883, 2014.

VERBRUGGE, F. H.; TANG, W. H. W.; HAZEN, S. L. Protein carbamylation and cardiovascular disease. **Kidney International**, v. 88, n. 3, p. 474–478, 2015.

WANG, Z. et al. Protein carbamylation links inflammation, smoking, uremia and atherogenesis. **Nature Medicine**, v. 13, n. 10, p. 1176–1184, 2007.

YADAV, S. P. S. et al. Mechanism of how carbamylation reduces albumin binding to FcRn contributing to increased vascular clearance. **American Journal of Physiology - Renal Physiology**, v. 320, n. 1, p. F114–F129, 2021.

YUAN, Y.; SUN, H.; SUN, Z. Advanced glycation end products (AGEs) increase renal lipid accumulation: A pathogenic factor of diabetic nephropathy (DN). **Lipids in Health and Disease**, v. 16, n. 1, p. 1–9, 2017.

ZANELLA, M. T. Microalbuminúria: fator de risco cardiovascular e renal subestimado na prática clínica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, p. 313–321, 2006.

ANEXOS**ANEXO A – ACEITE DO ARTIGO CIENTÍFICO II NO PERIÓDICO *CLINICAL LABORATORY***

Fwd: Manuscript #211008-Cassol - copyright transfer

----- Forwarded message -----

De: cnoske@clin-lab-publications.com <cnoske@clin-lab-publications.com>

Date: seg., 11 de out. de 2021 às 06:18

Subject: AW: Manuscript #211008-Cassol - copyright transfer

To: Rafael Noal Moresco <rnmoresco@ufsm.br>

Dear Professor Moresco,

Thank you very much for sending the revised version of your manuscript.

We are pleased to inform you that your manuscript entitled

„Impact of albumin carbamylation on colorimetric measurement of albumin“

has been accepted for publication in issue 06/2022 of our journal "***Clinical Laboratory***".

The manuscript will be forwarded to scientific and linguistic editing. After that you will receive the galley proof.

Please return the original of the signed copyright transfer as soon as possible with separate mail to the address of our Editorial Office:

Clinical Laboratory GmbH
Editorial Office
Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim/GERMANY

You can send us in addition a scanned copy of the signed copyright transfer with e-mail attachment.

Best regards,

Christina Noske (Mrs)

Clinical Laboratory Publications GmbH

Editorial Office

Stubenwald-Allee 8a

64625 Bensheim/GERMANY

T: +49 6251 70190-246

F: +49 6251 70190-409

E: cnoske@clin-lab-publications.com

Homepage: www.clin-lab-publications.com