

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ALBUMINA MODIFICADA PELA
ISQUEMIA NA ANEMIA ASSOCIADA
À DOENÇA RENAL CRÔNICA**

**Luiz Carlos Cichota
PPGCF**

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

**AVALIAÇÃO DA ALBUMINA MODIFICADA PELA
ISQUEMIA NA ANEMIA ASSOCIADA À
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

por

Luiz Carlos Cichota

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

Orientador: Prof. Dr. José Edson Paz da Silva

Co-Orientador: Prof. Dr. Rafael Noal Moresco

**Santa Maria, RS, Brasil
2007**

FOLHA DE FICHA CATALOGRÁFICA/DADOS DE PROPRIEDADE INTELECTUAL

© 2008

Todos os direitos autorais reservados a Luiz Carlos Cichota. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser com autorização por escrito do autor.

Endereço: Rua Jacinto Godoy, nº: 173, Bairro Centro, Erechim, RS, 99700-000

Fone: (0xx) 54 21061049; End. Eletr: chicota@uri.com.br

A Deus.

À Vera Lúcia, minha esposa e Luiza, nossa filha, que estiveram presentes em todas as etapas deste trabalho. Sem o apoio delas dificilmente chegaria ao fim.

À meus pais José e Pierina , pelo apoio ao longo de todos esses anos.

Ao meu sogro Severino e minha sogra Elia, pelo incentivo durante este trabalho.

Aos meus cunhados Ivomar, Teresinha, Gilnei, Eliane, Rodinei e Daiane, pelas palavras de motivação durante este estudo.

À Rafael e Patrícia, que foram a extensão da minha família em Santa Maria.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Edson Paz da Silva, orientador desta pesquisa, pela confiança, amizade e profissionalismo compartilhados.

Ao Prof. Dr. Rafael Noal Moresco, co-orientador, pelo incentivo, amizade e dedicação na realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM, pela oportunidade pessoal de aprimoramento científico.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFSM, Prof^a Dr^a Clarice M. Bueno Rolim, pelo apoio na realização deste estudo.

À Prof^a Ms. Marta M. Medeiros Frescura Duarte, pela atenção dispensada durante a realização das análises deste estudo.

À Prof^a Ms. Patrícia Gomes, pelo apoio e amizade durante o estudo.

Ao Prof. Ms. Carlos Alberto Brandão, pela amizade e grande incentivo.

Ao Prof. Dr. Arnaldo Nogaro, Diretor Acadêmico da Universidade Regional Integrada das Missões, URI-Campus Erechim, pelo apoio e confiança demonstrados.

Aos professores do curso de Farmácia da Universidade Regional Integrada das Missões, URI-Campus Erechim, pelo incentivo.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela amizade e companheirismo demonstrados.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão desta dissertação.

“Nenhuma atividade no bem é insignificante...
As mais altas árvores são oriundas de
minúsculas sementes.”

Francisco Cândido Xavier.

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

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

**AVALIAÇÃO DA ALBUMINA MODIFICADA PELA
ISQUEMIA NA ANEMIA ASSOCIADA À
DOENÇA RENAL CRÔNICA**

elaborada por
Luiz Carlos Cichota

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

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. José Edson Paz da Silva
(Presidente/Orientador)

Sérgio Luiz Dalmora, Dr. (UFSM)

Sonia T. dos Anjos Lopes, Dr^a (UFSM)

Santa Maria, 19 de dezembro de 2007.

RESUMO

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

AVALIAÇÃO DA ALBUMINA MODIFICADA PELA ISQUEMIA NA ANEMIA ASSOCIADA À DOENÇA RENAL CRÔNICA

AUTOR: Luiz Carlos Cichota

ORIENTADOR: José Edson Paz da Silva

CO-ORIENTADOR: Rafael Noal Moresco

Data e local da defesa: Santa Maria, 19 de dezembro de 2007.

A doença renal crônica (DRC) é altamente prevalente, com um aumento do número de pacientes no mundo inteiro, e a anemia é muito comum nestes pacientes. A anemia tem impacto negativo sobre a doença cardiovascular, capacidade de executar exercícios e a qualidade de vida, resultando numa significativa morbidade e mortalidade. O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de albumina modificada pela isquemia (IMA) e lactato em pacientes com anemia associada à DRC e sua correlação com os níveis de hemoglobina. Hematócrito, hemoglobina, ferro, ferritina, albumina, creatinina, lactato e IMA foram avaliados em 17 pacientes com anemia associada à DRC e em 19 pacientes do grupo controle, por métodos padronizados. Os resultados do hematócrito, hemoglobina, ferro e albumina foram menores no grupo de anêmicos do que no grupo controle. Ferritina, creatinina e lactato foram maiores no grupo de anêmicos do que no grupo controle. A IMA aumentou no grupo de anêmicos ($0,8115 \pm 0,1304$) ABSU se comparado ao grupo controle ($0,4951 \pm 0,0393$) ABSU. Foram observadas significativas correlações entre IMA e lactato, IMA e hemoglobina, IMA e creatinina e hemoglobina e lactato. A IMA e lactato aumentaram durante a anemia e esta elevação poderia ser associada com hipóxia devido aos baixos níveis de hemoglobina. Entretanto, nossos dados sugerem que o lactato possui maior sensibilidade na detecção da hipóxia na anemia, quando comparado com a IMA.

Palavras-chave: Albumina Modificada pela isquemia (IMA); lactato; hipóxia; anemia.

ABSTRACT

EVALUATION OF ISCHEMIA-MODIFIED ALBUMIN IN ANEMIA ASSOCIATED TO CHRONIC KIDNEY DISEASE

AUTHOR: Luiz Carlos Cichota

ADVISOR: José Edson Paz da Silva

Chronic kidney disease (CKD) is highly prevalent, with increasing numbers of patients affected by the disease world-wide, and anemia is a common finding in patients with CKD. Anemia impacts negatively on cardiovascular disease, exercise capacity and quality of life, resulting in a significant mortality and morbidity. The aim of this study was to evaluate the levels of ischemia-modified albumin and lactate in patients with established anemia associated to CKD and its correlations with hemoglobin levels. Hematocrit, hemoglobin, iron, ferritin, albumin, creatinine, lactate and IMA were measured in 17 patients with established anemia associated to CKD and 19 controls by standard methods. The results of hematocrit, hemoglobin, iron and albumin were lower in anemia group than control group. Ferritin, creatinine and lactate levels were higher in anemia of CKD group than control group. IMA increases in anemia group (0.8115 ± 0.1304) ABSU compared to control (0.4951 ± 0.0393) ABSU. Significant correlations between IMA and lactate, IMA and hemoglobin, IMA and creatinine, and hemoglobin and lactate were observed. IMA and lactate increase during anemia and this elevation could be associated to hypoxia due to low hemoglobin levels. However, our data suggest that lactate is more sensitive to detect hypoxia in anemia compared to IMA.

Key-words: ischemia-modified albumin (IMA), lactate, hemoglobin, hypoxia, anemia.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUÇÃO.....	13
2. OBJETIVOS.....	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
3.1. Hemoglobina.....	16
3.2. Anemia.....	17
3.3. Tipos de anemia.....	18
3.3.1. Anemias Não-hemolíticas carênciais.....	18
3.3.2. Anemias hemolíticas herdadas.....	20
3.4. Doença Renal Crônica.....	21
3.5. Anemia Associada à Doença Renal Crônica.....	22
3.6. Principais Parâmetros Laboratoriais Avaliados nas Anemias.....	25
3.7. Lactato.....	27
3.8. Albumina Modificada pela Isquemia.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
5. RESULTADOS.....	34
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÃO.....	42
8. REFERÊNCIAS.....	43
ANEXO.....	53

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Resultados de IMA observados nos grupos de pacientes estudados	35
FIGURA 2. Correlação significativa entre os níveis de IMA e hemoglobina nos pacientes avaliados neste estudo	35
FIGURA 3. Correlação significativa entre os níveis de IMA e lactato nos pacientes avaliados neste estudo	36
FIGURA 4. Correlação significativa entre os níveis de IMA e creatinina nos pacientes avaliados neste estudo	36
FIGURA 5. Correlação significativa entre os níveis de lactato e hemoglobina nos pacientes avaliados neste estudo	37

LISTA DE ABREVIATURAS

- DRC:** Doença renal crônica
- FG:** Filtração glomerular
- DCE:** Depuração da creatinina endógena
- IAM:** Infarto agudo do miocárdio
- EP:** Embolia pulmonar
- Hb:** Hemoglobina
- MDA:** Malonato Dialdeído
- EROs:** Espécies reativas do oxigênio
- Acil-CoA:** Acetil-coenzima A
- LDH:** Desidrogenase láctica
- DTT:** Ditionitrito
- IMA :** Albumina modificada pela isquemia

1. INTRODUÇÃO

A anemia, o sinal clínico mais freqüente na prática médica, é decorrente da diminuição da massa eritróide, com conseqüente liberação inadequada de oxigênio aos tecidos. Cada indivíduo, portanto, deve ter níveis de hemoglobina proporcionais ao tecido metabolicamente ativo, representado basicamente pela massa muscular. De acordo com a fisiopatologia pode ser decorrente de produção inadequada de hemácias, excesso de destruição ou perdas excessivas de sangue (LORENZI, 2006).

Os sintomas da anemia estão relacionados com seu grau, velocidade de instalação de desglobulização e condições nas quais sobrevêm. Uma anemia que se desenvolve muito rapidamente acarreta uma sintomatologia muito mais dramática que uma anemia crônica, com mesmo grau de anemia, pois nesta a adaptação à hipóxia é feita progressivamente. Além disso, o estado do paciente desempenha um papel importante em suas possibilidades de adaptação (EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006).

Entre as anormalidades encontradas na doença renal crônica (DRC), a anemia é a mais freqüente, sendo responsável por grande parte das alterações presentes, como insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular, angina, fraqueza, redução da atividade cognitiva, entre outras (ECKARDT, 2001). Estas alterações estão associadas diretamente à insuficiência das funções endócrinas e excretórias do rim. Além disso, essa insuficiência está relacionada à retenção de uma variedade de substâncias potencialmente tóxicas, incluindo algumas que podem inibir a eritropoese e outras que podem reduzir a sobrevivência dos eritrócitos. A falta de eritropoietina é, de longe, o mais importante desses fatores causadores de anemia; conseqüentemente, as características hipoproliferativas tendem a predominar (WINTROBE; LUKENS; LEE, 1998).

Nos exames clínicos associados à insuficiência renal crônica, fatores adicionais podem contribuir também para o desenvolvimento da anemia, mas estes devem ser considerados complicações ao invés de componentes fundamentais dessa anemia. Se os rins estiverem infectados ou inflamados, é provável que se observe a anemia de DRC (LORENZI, 2006).

A anemia ferropriva pode-se desenvolver devido à perda de sangue dos tratos genito-urinário, gastrintestinal ou no aparelho de hemodiálise. A anemia megaloblástica de deficiência de folato pode ocorrer também em pacientes que recebem diálise periodicamente. Também, a intoxicação por alumínio pode causar anemia nesses pacientes (PIERACCI; BARIE, 2006).

Como a hemodiálise pode prolongar eficazmente a vida dos pacientes com insuficiência renal, a prevalência desse tipo de anemia tem aumentado, por esse motivo o diagnóstico rápido e correto contribui para melhor monitoramento dos indivíduos portadores dessas doenças (ECKARDT, 2001). É importante destacar que as anemias são caracterizadas pela redução da quantidade de hemoglobina e/ou alteração no formato na molécula da mesma (SALTIN et al, 1986). Com isso, o transporte de oxigênio no organismo sofre alterações, uma vez que a hemoglobina desempenha um papel vital neste processo (EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006).

A oxigenação reduzida nos tecidos, oferecida pelos baixos níveis de hemoglobina, aciona o metabolismo anaeróbico, de modo que os produtos metabólicos da glicose na etapa do piruvato são convertidos em lactato, proporcionando uma elevação dos seus níveis no sangue (KOUKOURAKIS et al, 2006; LEE et al, 2006). Também ocorre hipóxia tecidual nos processos de isquemia, ocasionando modificações estruturais na albumina humana através da qual produz uma diminuição na capacidade de ligação da albumina com metais, principalmente o cobalto, levando a formação da albumina modificada pela isquemia (IMA) (BORDERIE et al, 2004).

Considerando a importância do oxigênio no sangue e nos tecidos, é importante que seja investigada a aplicabilidade de novos parâmetros laboratoriais para o monitoramento destes distúrbios. Dentre estes marcadores é possível destacar a albumina modificada pela isquemia (IMA), um novo marcador para processos isquêmicos caracterizados por hipóxia utilizado, principalmente, no diagnóstico de isquemia do infarto agudo do miocárdio (IAM) (CHO et al, 2007). Embora existam estudos recentes avaliando a IMA como um preditor de mortalidade na doença renal em estágio final (SHARMA et al, 2006), ainda não foi estudado o comportamento da IMA na anemia associada à doença renal crônica, bem como a sua relação com outros marcadores neste quadro, fato este que destaca a importância da realização deste estudo.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

- Investigar os níveis de albumina modificada pela isquemia nos indivíduos anêmicos, portadores de doença renal crônica com a finalidade de avaliar a hipóxia resultante destes distúrbios.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de albumina, lactato e albumina modificada pela isquemia, em indivíduos anêmicos portadores de doença renal crônica.
- Avaliar os níveis de ferro sérico, creatinina, ferritina, hematócrito e hemoglobina, em indivíduos anêmicos portadores de doença renal crônica.
- Investigar o grau de associação entre os níveis de hemoglobina, lactato, creatinina e albumina modificada pela isquemia nos quadros de anemia na doença renal crônica.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. Hemoglobina

A hemoglobina é uma substância pigmentada de peso molecular de 64.000 dáltons se apresentando integralmente dentro das hemácias. É formada pelo grupo heme e por uma porção protéica, a globina. Suas principais funções são a absorção e o transporte do oxigênio no sangue e a liberação destes aos tecidos (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005). Além desta função, exerce um efeito tampão, impedindo que os íons H^+ possam alterar o pH do sangue, com conseqüências danosas ao organismo. Deste modo, embora haja grande produção de gás carbônico pelos tecidos, a presença da hemoglobina restringe as variações de pH a apenas centésimos de unidade, mantendo o sangue e os tecidos em meio notavelmente constante (BERNE; LEVY, 1996).

No transporte de gases respiratórios o oxigênio se combina na hemoglobina com o radical heme em ligação instável, surgindo a oxiemoglobina, e o gás carbônico se combina com os grupamentos aminados laterais da globina, para constituir a carbo-hemoglobina. A oxiemoglobina desprende o oxigênio ao nível dos tecidos e a carbo-hemoglobina desprende o gás carbônico ao nível dos alvéolos pulmonares (BERNARD et al, 1989). A combinação desses gases com a hemoglobina e o seu desprendimento se processa em função das diferenças de pressão parcial dos mesmos no sangue, nos tecidos e no ar alveolar. O monóxido de carbono, quando inspirado, se liga de forma estável à molécula de hemoglobina, inutilizando-a irreversivelmente. Nesse caso, o produto formado é carboxiemoglobina (OFSTHUM et al, 2003). A hemoglobina se forma no citoplasma dos eritroblastos ao nível do ribossomo, a partir da síntese de quatro cadeias polipeptídicas formadas por aminoácidos que caracterizam as globinas normais do indivíduo adulto: alfa, beta gama e delta (NETO; PITOMBEIRA, 2003).

No período embrionário e início da vida fetal há tipos de hemoglobina que desaparecem após o nascimento. As cadeias zeta e épsilon se reúnem formando a hemoglobina denominada Gower 1, a hemoglobina Portland ou a hemoglobina Gower 2, características do embrião. Já no período fetal surge a hemoglobina

composta por duas cadeias alfa e duas cadeias gama, denominada hemoglobina Fetal (HbF). No adulto estão presentes a hemoglobina A (HbA) e a hemoglobina A₂ (HbA₂), ambas formadas por duas cadeias alfa e duas cadeias beta (LORENZI, 2006). Existem algumas patologias na formação das hemoglobinas as quais são denominadas de hemoglobinopatias, sendo uma das mais freqüentes, a troca na HbA do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta formando a hemoglobina S (HbS), e a troca do ácido glutâmico pela lisina na posição seis da cadeia beta originando a hemoglobina C (HbC) (ADORNO et al, 2005).

O grupo heme é a parte da hemoglobina que contém ferro, o qual chega aos precursores eritoblásticos ligado à sua proteína transportadora, a transferrina. O complexo ferro-transferrina fixa-se à membrana citoplasmática dos eritoblastos através de receptores específicos. A absorção do ferro é feita após a dobras de pequenas porções da membrana celular, de modo a se formarem vesículas intracitoplasmáticas onde ele permanece já desligado da transferrina. Esta volta ao plasma sem ferro (apotransferrina) para servir novamente como transportadora (DUBB; RAHMANTO; RICHARDSON, 2006).

A anemia é um sintoma-sinal originado por vários distúrbios orgânicos subjacentes. Não é, portanto, uma doença em si, mas conseqüência de alterações que comprometem o binômio hemácia/hemoglobina. Em resumo, pode se dizer que em qualquer tipo de anemia existe déficit de hemoglobina e/ou de hemácias circulantes (WINTROBE; LUKENS; LEE, 1998).

3.2. Anemia

A anemia é a diminuição da taxa de hemoglobina abaixo de níveis mínimos, arbitrados pela Organização Mundial da Saúde em 13 g/dL para homens adultos, 12 g/dL para mulheres adultas e crianças de 6 a 12 anos, e 11 g/dL para gestantes e crianças de 6 meses a 6 anos. Como pode decorrer de múltiplas causas, é considerada uma síndrome. Sua prevalência, liderada pela anemia ferropênica, é tão elevada que se constitui um problema mundial de saúde pública (FAILACE, 1995).

As células sangüíneas são produzidas principalmente na medula óssea. A medula óssea é constituída por tecido esponjoso mole localizado no interior de ossos chatos. É nela que o organismo produz, praticamente, todas as células do sangue, hemácias, leucócitos e plaquetas. Estes componentes do sangue são

renovados continuamente e a medula óssea é quem se encarrega desta renovação. Trata-se, portanto, de um tecido de extrema atividade, evidenciada pelo grande número de multiplicações celulares (CAVALCANTE, 2005). É importante destacar que, no terceiro mês de embriogênese, o fígado é o principal sítio de formação de células sanguíneas, até pouco antes do nascimento. No início do quarto mês de desenvolvimento embrionário, as células-tronco migram em direção à medula óssea para iniciar a hematopoese neste local. Ao nascimento, a medula presente em todo o esqueleto participa da hematopoese, sendo fonte exclusiva de células sanguíneas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

3. 3. Tipos de anemia

3.3.1. Anemias não-hemolíticas carenciais

A hematopoese exige um suprimento constante de três nutrientes essenciais: o ferro, a vitamina B₁₂ e ácido fólico, bem como a presença de fatores de crescimento hematopoiético. Os suplementos desses nutrientes essenciais ou dos fatores de crescimento, quando inadequados, resultam em deficiência de células funcionais (KATZUNG, 2003).

O ferro é um elemento essencial para os humanos, sendo o íon central do grupo heme, o constituinte não-protéico da hemoglobina. A hemoglobina é responsável pelo transporte e distribuição do oxigênio dos pulmões até os tecidos (ROCHA et al, 2004). A deficiência de ferro causa uma diminuição de síntese do grupo heme, levando à anemia que resulta em hipóxia dos tecidos. Além de ser constituinte da hemoglobina, o grupo heme também está presente na mioglobina do tecido muscular (GAW et al, 2001). Existem cerca de 3 a 4 g de ferro no organismo, sendo que três quartos estão presentes formando complexos com o grupo heme. A maior parte do restante é encontrada na forma de reservas teciduais ligadas às proteínas de armazenamento de ferro, sendo estas a ferritina e a hemossiderina. Menos de 1% do ferro corporal total está no plasma, sendo este associado à proteína de ligação do ferro, a transferrina (GAW et al, 2001). Em condições normais o organismo consegue, através de reciclagem, conservar e reutilizar o ferro já absorvido anteriormente, isto é, a cada 120 dias as hemácias são removidas da circulação sanguínea pelo sistema retículo-endotelial, aproximadamente 90% do

ferro do plasma retorna à medula óssea, sendo reutilizado para a produção de novos glóbulos vermelhos, e os 10% restantes são utilizados por células de outros sistemas ou seguem para o depósito (BRAGA; MEZIARA; FISBERG, 1995). O ferro proveniente da dieta chega à membrana da célula epitelial intestinal como ferro heme e não-heme. O ferro heme não sofre ação dos fatores do lúmen gastrointestinal, e assim, após interação com o receptor de ferro da membrana do enterócito, o grupo heme é internalizado e, sob ação da enzima heme-oxigenase, é liberado do anel de protoporfirina, permitindo a sua passagem para o plasma (STOLTZFUS, 2003). O ferro não heme passa à membrana do enterócito de duas maneiras: difusão ou por sistema transferrina-receptor presente na luz intestinal (BRAGA ; MEZIARA; FISBERG, 1995).

A deficiência de ferro pode ser produzida principalmente de três maneiras: (1) ingestão insuficiente de ferro para repor as perdas normais do elemento; (2) ferro não-disponível para a eritropoese, apesar de quantidades adequadas de ferro corporal; e (3) perda aumentada de ferro corporal (perda sangüínea), inadequadamente reposta através da ingestão normal (RAVEL, 1997). Os estágios associados ao desenvolvimento da deficiência de ferro se correlacionam com os achados laboratoriais. No primeiro estágio ocorre a depleção dos estoques de ferro no fígado, baço e medula óssea, caracterizando-se pela diminuição da ferritina sérica. No segundo estágio observa-se declínio da concentração de ferro (ferro sérico) e aumento na capacidade de ligação de ferro. Finalmente, no terceiro estágio ocorre queda nos níveis de hemoglobina, caracterizando-se por desenvolvimento de anemia microcítica e elevação da protoporfirina eritrocitária livre (BRAGA; MEZIARA; FISBERG, 1995).

As anemias de origem carencial são as que têm maior interesse e maior prevalência, em especial nos países em desenvolvimento (POLLITT, 2001). A anemia ferropriva ocorre quando as reservas de ferro do organismo são insuficientes para manter a eritropoese e, conseqüentemente, a concentração normal de hemoglobina no sangue (MIRANDA et al., 2003). O ferro sérico reflete o equilíbrio entre o ferro absorvido, o ferro utilizado na síntese da hemoglobina, o ferro liberado pela destruição dos eritócitos e o tamanho do compartimento de depósito. Apresenta como desvantagem uma grande variabilidade biológica, quando comparado com os demais testes (BRAGA; MEZIARA; FISBERG, 1995). Vários estudos constataram

que a determinação da hemoglobina é mais sensível e precisa do que o hematócrito na detecção de anemia em adultos e recém-nascidos (RAVEL, 1997).

3.3.2. Anemias hemolíticas herdadas

A síntese de hemoglobina humana é controlada por dois complexos (clusters) de genes localizados no cromossomo 16 (clusters dos genes α -símiles) e no cromossomo 11 (clusters dos genes β -símiles), na ordem cronológica em que são expressos, nos períodos embrionário, fetal e adulto, quando diferentes grupos de genes são ativados ou inibidos e diferentes cadeias globínicas são produzidas independentemente, e para que se forme um tetrâmero funcional é necessária uma síntese eqüimolar das cadeias α e β (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2001; NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Nas anemias herdadas, as anormalidades da síntese de hemoglobina podem ser divididas em dois grupos: as caracterizadas por variantes de hemoglobina estruturalmente anormais e àquelas, nas quais, uma ou mais cadeias normais de polipeptídios de hemoglobina são sintetizadas a uma taxa reduzida. As alterações estruturais incluem substituições simples e duplas de aminoácidos, deleções e adições de aminoácidos e cadeias de fusão formadas de duas cadeias de polipeptídios diferentes. A maioria das hemoglobinas anormais difere da hemoglobina normal na substituição de um aminoácido simples por um outro (WINTROBE; LUKENS; LEE, 1998).

As hemoglobinopatias constituem um grupo de doenças genéticas, caracterizadas por alterações na porção globínica da molécula de hemoglobina, com elevada distribuição mundial. Estas alterações podem ser classificadas como estrutural e de síntese. As alterações estruturais incluem a substituição, deleção e inserção de um ou mais aminoácidos, como também a fusão de duas cadeias globínicas diferentes, causando a formação de uma hemoglobina anormal. As alterações de síntese, chamadas de talassemias, são caracterizadas pela síntese reduzida ou nula de um ou mais tipos de cadeias globínicas. A hemoglobina variante de maior frequência mundial é a HbS (ADORNO et al, 2005).

A alteração estrutural mais importante é a HbS ($\alpha_2\beta_2^S$), cujo estado homocigoto resulta na anemia falciforme. A HbS resulta da substituição do ácido

glutâmico pela valina na posição 6 (seis) na cadeia β -globina. O gene da HbS em alguns países africanos, atinge 40% da população, e em países onde a população imigrante africana é alta, como na América do Norte, América do Sul, alguns países da Europa e parte da Índia também têm uma frequência elevada. A anemia falciforme no Brasil, especialmente nas regiões norte, nordeste e sudeste, é a doença hereditária de maior prevalência, estimando-se 0,1 a 0,3% da população negra, com tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população, devido ao alto grau de miscigenação em nosso país (BANDEIRA et al, 1999; SILLA, 1999; ADORNO et al, 2005).

A mutação que ocasionou a síntese desta hemoglobina anormal é responsável por inúmeras alterações fisiopatológicas e físico-químicas na molécula de HbS quando em baixa tensão de oxigênio (EATON; HOFRICHTER, 1987). A fisiopatogenia da anemia falciforme depende, fundamentalmente, da falcização dos eritrócitos. Se esse fenômeno pudesse ser impedido, a morbidade da doença seria, portanto, reduzida consideravelmente. Os pacientes com anemia falciforme apresentam uma hemólise constante, de pequena ou moderada intensidade, exacerbada periodicamente nas chamadas crises hemolíticas. Mais do que a anemia, no entanto, têm uma importância clínico-patológica os processos vaso-occlusivos, que podem causar estase sangüínea, trombose, isquemia, dano orgânico em qualquer parte do organismo, principalmente em regiões irrigadas por pequenos vasos (GIROT; BEGUE, 2004; BUKANAY et al, 2005; STEIMBERG, 2005).

3.4. Doença renal crônica (DRC)

A doença renal crônica (DRC) é uma síndrome metabólica decorrente de uma perda progressiva, geralmente lenta, da capacidade excretória renal (MOTTA, 2000). A excreção de catabólitos é resultante principalmente da filtração glomerular (FG). A DRC consiste em uma perda progressiva da FG que pode ser avaliada clinicamente pela elevação dos níveis de creatinina no sangue, sendo este um teste simples usado como o principal indicador da função renal (BERNE; LEVY, 1996). Entretanto, esta elevação é observada somente quando há dano aos néfrons funcionais. Portanto a creatinina não é um teste adequado para detectar uma doença renal em seu estágio inicial. Uma avaliação melhor da função renal é dada pelo teste de depuração da creatinina endógena (DCE) (PERLMAN et al, 2005). Em indivíduos

normais a FG é da ordem de 110 à 120 ml/min correspondente à função de filtração de cerca de 2.000.000 de néfrons. Em indivíduos com DRC a filtração se reduz consideravelmente, podendo chegar, em casos avançados, até 5-10 ml/min. A consequência bioquímica dessa redução de função se traduz pela retenção, no organismo, de vários solutos tóxicos geralmente provenientes do metabolismo protéico, que podem ser avaliados indiretamente através das dosagens de uréia e creatinina no sangue, que se elevam progressivamente (EL NAHAS; BELLO, 2005).

A creatinina é um composto orgânico nitrogenado e não protéico formado a partir da desidratação da creatina. A creatina é sintetizada nos rins, fígado e pâncreas e transportada para outros órgãos como músculo e cérebro, onde é fosforilada através da enzima creatinaquinase e estocada como fosfocreatina (SWAMINATHAN et al, 2000). A referência dos níveis de creatinina no sangue de indivíduos normais é considerada para mulheres de 0,5 a 1,0 mg/dL e para homens de 0,7 a 1,2 mg/dL. Entretanto, os níveis dependem da massa muscular do indivíduo, quanto maior a massa, maior os níveis (MOTTA, 2000). Através da medida da creatinina do sangue, do volume urinário das 24 horas e da creatinina urinária é possível calcular a depuração da creatinina endógena (DCE), que é proporcional à taxa de FG. Em indivíduos portadores de doença renal os níveis de creatinina no sangue na fase que antecede a doença renal ficam entre 2 a 3 mg/dL, já na fase inicial da doença os valores ficam entre 6 a 8 mg/dL, níveis estes, que levam a indicação de diálise ou transplante renal (BERNE; LEVY, 1996).

A proteinúria também é muito intensa na DRC, em razão do aumento da permeabilidade glomerular, principalmente para a albumina. Por este motivo ocorre a hipoproteinemia que é o reflexo da perda urinária de proteínas. Esta desnutrição proteico-calórica e a hipoalbuminemia são fatores bem documentados de mau prognóstico nos indivíduos que estão em programas de diálise (MOTTA, 2000).

O conjunto de sintomas, sinais clínicos e achados anormais nos estudos da DRC auxiliam no diagnóstico. Entre estes, a anemia é um distúrbio importante a ser considerado (ESCHBACH; ADMSON, 1985).

3.5. Anemia associada à doença renal crônica

A associação entre a anemia e a doença renal crônica (DRC) é conhecida há mais de 150 anos e, entre as alterações hematológicas encontradas no paciente

urêmico, a anemia é a mais freqüente, sendo responsável por grande parte da sintomatologia por ele referida (KERR, 2006). A anemia não-tratada é associada a diversas anormalidades fisiológicas observadas nessa população, incluindo insuficiência cardíaca, hipertrofia ventricular, angina, redução da atividade cognitiva, alterações menstruais e disfunção sexual, queda da resposta imune, entre outras (KERR, 2006). Essas condições comprometem a qualidade de vida e dificultam a reabilitação dos pacientes. Além disso, a presença de anemia consiste, por si só, em um fator de risco de mortalidade para pacientes hemodialisados (ECKARDT, 2001).

A anemia de origem renal, usualmente, é normocrômica e normocítica. Embora não exista uma correlação estreita entre os níveis de hematócrito e a filtração glomerular, observa-se a redução do hematócrito quando a concentração da creatinina plasmática é superior a 2 mg/dl, que é progressiva e concomitante ao declínio da filtração glomerular (BERENSHTEIN et al, 1997).

Os fatores envolvidos na patogênese da anemia associada com a doença renal crônica são três. O primeiro e mais importante fator é a secreção reduzida da eritropoietina. Um segundo fator é a depressão da medula resultante dos efeitos de substâncias tóxicas retidas. O terceiro fator é a sobrevivência reduzida dos eritrócitos (WISH; COYNE, 2007).

A eritropoietina é um hormônio glicoprotéico secretado principalmente pelos rins, que regula a proliferação e a diferenciação das células progenitoras dos eritrócitos na medula óssea. Sua liberação ocorre quando os rins percebem a redução na entrega de oxigênio para os tecidos através do sangue (MADONE et al, 1997; MOTTA, 2000;). A observação de que a taxa de eritropoese melhora em pacientes tratados com diálise, apesar dos níveis de eritropoietina estarem inalterados, sugere que as toxinas urêmicas retidas podem deprimir diretamente a eritropoese. A poliamina espermina pode ou não ser um inibidor eritropoético no soro urêmico, juntamente com outros inibidores que são menos caracterizados, incluindo um lipídio e um polipeptídeo com baixo peso molecular. O hiperparatireoidismo secundário pode também contribuir para essa depressão (EKNOUAN, 2007). Outro fator patogênético é a hemólise. A sobrevivência dos eritrócitos, embora freqüentemente dentro dos limites normais, pode estar leve a moderadamente reduzida. Uma suposição razoável é a de que os fatores hemolíticos constituem uma substância tóxica normalmente excretada ou metabolizada pelos rins (ASTOR et al, 2002). A guanidina e seus derivados parecem

constituir um subconjunto dos muitos metabólitos retidos que afetam adversamente a sobrevivência dos eritrócitos (WINTROBE; LUKENS; LEE, 1998).

A ferritina sérica normalmente contém 1% do ferro sérico e está em equilíbrio com os depósitos do organismo, refletindo as variações na quantidade de ferro total armazenado (FISHBANE, 2007). Assim, a medida da ferritina sérica é um indicador muito sensível da deficiência de ferro quando não acompanhada de outra doença concomitante (BETSY; NIKO; TOMÁS, 2006). Encontram-se elevações da ferritina sérica quando ocorre aumento das reservas de ferro e também em vários distúrbios, como a doença renal crônica, artrite reumatóide, desordens inflamatórias crônicas, entre outras (MOTTA, 2000).

Outra alteração metabólica encontrada em pacientes com DRC é a diminuição de oxidação de ácidos graxos, uma importante rota metabólica para a produção de energia (RICANATI; TSEMG; HOPPEL, 1987). A carnitina, cuja homeostase está anormal na insuficiência renal crônica, é um co-fator obrigatório para a oxidação dos ácidos graxos de cadeia longa e um tampão do metabolismo da acetil-coenzima A (Acil-CoA), formando a acil-carnitina (LENNON; SHRAGO; MADDEN, 1986). O metabolismo incompleto dos ácidos graxos e o conseqüente acúmulo de acil-CoA são tipicamente vistos em pacientes com insuficiência renal (BIEBER, 1988). A presença de acil-CoA inibe numerosas enzimas do metabolismo intermediário. A conversão de acil-CoA para acil-carnitina pode, portanto, constituir um sistema normal de recuperação de radicais acil tóxicos que são gerados em excesso na insuficiência renal (BRASS; HOPPEL, 1980). O excesso de acil-carnitina no citosol diminui a fosforilação oxidativa, deprimindo o funcionamento do ciclo de Krebs e, portanto, diminuindo a produção aeróbia de energia (HIATT; REGENSTEINER; WOLFEL, 1989).

Os quadros de anemia normalmente estão associados à hipóxia dos tecidos, sendo esta caracterizada pela redução da oxigenação tecidual (LEE et al, 2006). Em condições de hipóxia tecidual grave, o metabolismo aeróbio é incapaz de funcionar adequadamente, de modo que os produtos metabólicos da glicose na etapa do piruvato são convertidos em lactato através do metabolismo anaeróbico. Por conseguinte, o aumento do lactato sangüíneo indica uma redução significativa da oxigenação tecidual (RAVEL, 1997; KOUKOURAKIS et al, 2006).

Recentemente, tem sido demonstrada a eficácia da avaliação da albumina modificada pela isquemia IMA, um novo marcador bioquímico, na investigação de

alguns distúrbios caracterizados pela redução do oxigênio, incluindo algumas síndromes coronarianas agudas (SINHA et al, 2004). Os níveis de IMA também apresentam elevação nos quadros de isquemia da musculatura esquelética induzida por exercícios (ROY et al., 2004) e no estágio final da doença renal (SHARMA et al, 2006).

3.6. Principais parâmetros laboratoriais avaliados nas anemias

A avaliação laboratorial das anemias inclui a realização de hemograma, o qual fornece importantes informações referentes à série vermelha. O hematócrito e a hemoglobina permitem ao clínico uma avaliação dos glóbulos vermelhos, sendo que esta, sempre apresenta alteração nas situações de anemia (HENRY, 1989). O hematócrito representa a percentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue. Os valores médios são diferentes segundo o sexo e variam entre 42% e 52% nos homens e 36% e 42% nas mulheres (FAILACE, 1995). Nas anemias, geralmente, os valores do hematócrito estão diminuídos, significando com isso, que existe pouca quantidade de glóbulos vermelhos para o volume de sangue (LORENZI, 2006).

Quando a concentração de hemoglobina no sangue diminui aquém de níveis arbitrados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) de 13 g/dl para homens, 12 g/dl para mulheres e 11 g/dl para gestantes e crianças entre 6 meses e 6 anos, ocorre um processo anêmico. A falta de hemoglobina como regra acompanhada de diminuição do número de glóbulos vermelhos, que são suas células carreadoras, causa a falta de oxigênio em todos os órgãos, com sinais clínicos daí decorrentes (STOLTZFUS, 2003). Alguns achados microscópicos, incluindo microcitose e hipocromia, também são característicos nos pacientes portadores de anemia ferropênica (FAILACE, 1995). Os níveis séricos de ferro possuem o intervalo de referência entre 50 µg/dl a 150 µg/dl, normalmente estão diminuídos nos pacientes com anemia ferropênica devido à deficiência deste elemento no organismo. O ferro sérico faz parte da molécula da hemoglobina, sendo que 67% do ferro total do organismo é utilizado para compor o pigmento dos glóbulos vermelhos (VERRASTRO; LORENZI; WENDEL NETO, 2005). O transporte de ferro no sangue é feito pela transferrina, proteína produzida pelo fígado que se liga, através de seus receptores, a dois átomos de ferro. Os níveis de transferrina considerados normais

no sangue são de 250 mg/dl a 400 mg/dl, sendo que na anemia ferropriva, o nível de transferrina está elevado, mas seu percentual de saturação está diminuído. Além da função de transporte, a transferrina minimiza os níveis de ferro livre no plasma, como a perda urinária e também prevenindo os potenciais efeitos tóxicos de níveis elevados deste metal livre circulante (RAVEL, 1997).

A ferritina é a principal proteína de armazenamento fisiológico de ferro, sendo sintetizada no fígado, baço e outros tecidos do organismo. Sua molécula tem estrutura especial que permite ao ferro entrar e sair livremente de seu interior. Os valores de referência da ferritina são de 12 µg/dl a 300 µg/dl e se encontram diminuídos na anemia por deficiência de ferro, permitindo o diagnóstico diferencial entre anemia ferropriva e anemias devido a outras causas (RAVEL, 1997; GAW et al, 2001).

A vitamina B₁₂ e folatos têm vários pontos em comum na fisiologia das células sangüíneas, em especial dos glóbulos vermelhos. Essas substâncias são encontradas nos alimentos de origem animal e vegetal, sendo necessárias em pequenas quantidades. Entretanto, em condições de desnutrição crônica, sua ausência é responsável por quadro de anemia importante, além de sintomatologia geral de fraqueza e quadro neurológico mais ou menos grave (KATZUNG, 2003).

A dose diária de vitamina B₁₂, também chamada de ciano-cobalamina, necessária para um indivíduo é de 1 a 2 µg, sempre inferior àquela presente numa dieta normal. Há uma reserva de vitamina B₁₂ de cerca de 300 µg, suficiente para manter níveis plasmáticos normais por vários anos, mesmo sob regime alimentar deficiente. O ácido fólico está presente numa dieta normal de 200 a 400 µg/dia, suficiente para manter o depósito normal no homem adulto da ordem de 10 a 20 mg/dl (MOTTA, 2000).

A diminuição dos níveis de ácido fólico e cobalamina alteram a eritropoese, produzindo deficiência na maturação e multiplicação nuclear, enquanto que a síntese de hemoglobina ocorre normalmente no citoplasma. O número insuficiente de mitoses conduz a um aumento do tamanho das células produzidas originando os megaloblastos. Estas anemias são conhecidas como megalobásticas (KUMAR et al, 2005).

O diagnóstico de anemia é realizado pelo hemograma. A análise dos índices hematimétricos possibilita a classificação morfológica e fisiopatológica,

respectivamente, permitindo a colocação do caso em estudo em um ou mais dos grandes grupos. Entretanto, o diagnóstico preciso é apontado somente por exames específicos freqüentemente encontrados na prática clínico-laboratorial (FAILACE, 1995).

3.7. Lactato

O lactato é o produto final da degradação da glicose na ausência de oxigênio (glicose anaeróbica) e é produzido pela redução do piruvato. A relação normal entre o piruvato e o lactato é de aproximadamente 20:1. Em condições basais a produção de lactato é de aproximadamente 0,8 mmol/Kg/hora (MOTA, 2000). Nas condições de hipóxia, o piruvato é preferencialmente reduzido a lactato e a relação entre o lactato e o piruvato se eleva (MICHAEL et al, 2005). O lactato é produzido em todos os tecidos; entretanto, os músculos, o cérebro, as hemácias e a medula renal são responsáveis pela maioria de sua produção no organismo. Os níveis normais de lactato no sangue arterial são de aproximadamente 0,62 mmol/l, enquanto que no sangue venoso os níveis são ligeiramente mais elevados, da ordem de 0,99 mmol/l (GAW et al, 2001). O piruvato é o único precursor do lactato e é produzido no citoplasma celular, pelo metabolismo da glicose através da glicólise pela via de Embden-Meyerhof, na ausência de oxigênio (HANNAN et al, 2005). Quando o oxigênio está disponível nas células, o piruvato penetra nas mitocôndrias e é fracionado a dióxido de carbono e água. Esse último processo gera muito mais energia para o metabolismo celular. O lactato pode sofrer duas transformações, sendo reconvertido em piruvato ou sendo filtrado pelos glomérulos renais para a eliminação urinária. Apenas 2% do lactato existente no sangue é excretado através da urina. Entretanto, quando ocorre um excesso de lactato no sangue, a eliminação urinária pode alcançar valores maiores, de cerca de 10 a 12%. O fígado e os rins são grandes consumidores de lactato e, em condições normais, são órgãos com capacidade de utilizar até 60% do lactato disponível (SARA et al, 2003).

A anemia por deficiência de ferro induz o aumento dos níveis de lactato (CEYHAN; OZALP; ALTAY, 1988). A dosagem de lactato realizada no plasma de ratos com este tipo de anemia foi significativamente elevada (OHIRA et al, 1983). A oxigenação reduzida pelos baixos níveis de hemoglobina resulta em hipóxia, a qual

aciona o metabolismo anaeróbico, caracterizando uma correlação inversa entre os níveis de lactato e hemoglobina (HAALAND et al, 1996).

A adequada oxigenação dos tecidos e a homogênea distribuição dos fluxos para os órgãos evitam o desenvolvimento de hipóxia ou isquemia celular e, dessa forma, impedem o desenvolvimento de metabolismo anaeróbico e a conseqüente produção de ácido láctico, origem da deterioração das funções dos principais sistemas vitais (GREGG et al, 1989).

3.8. Albumina modificada pela isquemia (IMA)

A albumina humana é constituída de uma única cadeia de 585 aminoácidos com três domínios estruturalmente homólogos e largamente helicais (I, II e III) e cada domínio é dividido em dois subdomínios, A e B (HE; CARTER, 1992). No N-terminal da albumina, os três primeiros aminoácidos são o aspartato, alanina e histidina, sendo este o local mais amplo e específico para a transição de metais, tais como o cobalto, cobre e o níquel (CHO et al, 2007). Esta região fica susceptível à degradação, comparada com outras regiões da albumina, quando exposta às condições de isquemia, hipóxia, acidose e ação dos radicais livres, formando a albumina modificada pela isquemia (IMA) (LEE et al, 2007). A mudança que ocorre no N-terminal promove a redução da afinidade da albumina pelo cobalto, cobre e níquel, ficando estes livres em maior quantidade (FAGAN et al, 2002; GIDENNE et al, 2004; MAGUIRE et al, 2006).

Baseado nestas alterações bioquímicas, Bar-Or; Lau; Wikler (2000) descreveram um método rápido, colorimétrico para a mensuração das alterações induzidas pela isquemia na capacidade de ligação da albumina ao cobalto exógeno. Elevadas ou reduzidas concentrações de albumina podem afetar as dosagens de IMA, produzindo valores mais baixos ou mais altos, respectivamente (GAZE; CROMPTON; COLLINSON, 2006). A razão para tal interferência é relacionada ao princípio do método. Na verdade, quando ocorre redução da albumina, menos cobalto se liga à albumina, permitindo com que uma maior quantidade de cobalto venha a reagir com o DTT, e vice-versa (LIPPI et al, 2007). Entretanto, recentemente foi sugerido que dois terços de cobalto pode se ligar aos subdomínios A e B da albumina, restando um terço para se ligar ao N-terminal (MOTHES; FALLER, 2007).

A IMA tem sido avaliada, recentemente, como marcador de isquemia cardíaca. Nos pacientes com alterações no eletrocardiograma, os marcadores bioquímicos tradicionais para avaliação de necrose cardíaca (CK, CK-MB e troponina) são usados para a confirmação do diagnóstico do infarto agudo do miocárdio (IAM) em períodos de 6 a 12 horas após o evento. Esses marcadores são enviados para a circulação só depois de lesão celular irreversível, porém, quando se trata de episódios reversíveis de isquemia, estes não se elevam no sangue (GIDENNE et al, 2004).

Estudos indicam que os níveis de IMA elevam-se minutos após o início da isquemia, permanecendo elevados por 6 a 12 horas, e retornando aos níveis normais em 24 horas (MORROW et al, 2003; APPLE et al, 2005; WORSTER et al, 2005). Isso sugere que a dosagem de IMA pode ser um efetivo marcador, tanto para detecção imediata de isquemia, quanto para isquemia na ausência de necrose (CHRISTENSON et al, 2001; GIDENNE et al, 2004; CHO et al, 2007; LEE et al, 2007). Portanto, a dosagem da IMA tem demonstrado ser um bom marcador para o diagnóstico rápido de isquemia do miocárdio, podendo levar à rápida avaliação em pacientes com baixo e intermediário risco de IAM (BHAGAVA et al, 2003).

A alta sensibilidade para o diagnóstico de síndromes coronarianas agudas é evidente, mas comparativamente tem uma baixa especificidade (SINHA et al, 2004). O alto valor preditivo negativo e a alta sensibilidade da IMA podem ser de grande importância, tanto sozinha como em combinação com marcadores de necrose, reduzindo a grande admissão inapropriada de pacientes de baixo risco nos serviços de emergência dos hospitais (CHRISTENSON et al, 2001). Embora a IMA seja útil para a detecção da isquemia miocárdica, a correlação quantitativa entre este marcador e a extensão da isquemia não tem sido reproduzível e geralmente tem sido falha. Esta pobre correlação pode parcialmente ser explicada pela complexidade entre a isquemia, IMA e a pré-condição isquêmica (CHO et al, 2007).

Recentemente foi constatado que a elevação dos níveis de IMA prediz a mortalidade em pacientes com doença renal em estágio final (SHARMA et al, 2006). Nestes pacientes ocorre um desequilíbrio entre a atividade oxidante e antioxidante, bem como o aumento nos níveis de radicais livres. Os níveis de antioxidantes enzimáticos como a glutadiona peroxidase, superóxido dismutase e catalase estão reduzidos, permitindo o aumento de espécies reativas de oxigênio (EROs), o que caracteriza a condição de estresse oxidativo (ROY et al, 2006). A peroxidação de

lipídios é a principal característica do estresse oxidativo, contribuindo desta forma na fluidez das membranas das células. As membranas e organelas celulares possuem grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. A fluidez da membrana relaciona-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol, e danos desta camada lipídica tendem a diminuir a fluidez da membrana (ROY; KASKI, 2007). O ataque de algumas EROs que abstraem um átomo do hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, inicia o processo de peroxidação lipídica. O malonataldeído (MDA) é um aldeído de cadeia curta, sendo um dos compostos medidos pela reação com o ácido tiobarbitúrico. Sua concentração tem sido utilizada para estimar a intensidade da peroxidação lipídica em sistemas biológicos, tecidos e células (VALENTINI et al, 2007).

A peroxidação de lipídios causa um aumento da rigidez e deformidade das membranas das hemácias que, por sua vez, aumenta a suscetibilidade destes à hemólise (MIGUEL; LINARES; PEREZ, 1988). A ocorrência desses fatores contribui para o aparecimento de anemia nos pacientes renais (DURAK et al, 1994). Estes pacientes possuem o lado esquerdo ventricular maior, função sistólica diminuída e maiores pressões ventriculares esquerdas, sendo que estas variações ocorridas se devem aos mecanismos alternativos para o consumo de oxigênio como o aumento de batimentos cardíacos para compensar a diminuição dos níveis de hemoglobina na anemia (ECKARDT, 2001; SHARMA et al, 2006; KUTZ et al, 2007).

A redução destes níveis pode alterar a entrega de oxigênio aos tecidos originando a condição de hipóxia, fator este que altera a transição de metais como, cobalto, cobre e níquel no N-terminal da albumina formando a IMA, sendo que estas variações exercem um papel importante na regulação da concentração de oxigênio na corrente sanguínea (ROACH et al, 1999; SBAROUNI et al, 2006).

Recentemente foi publicado um estudo avaliando os níveis de IMA na embolia pulmonar (TUREDI et al., 2007). Nos pacientes com embolia pulmonar (EP), ocorre formação de um trombo no sistema venoso profundo, que se desprende e, atravessando as cavidades diretas do coração, obstrui a artéria pulmonar ou um de seus ramos. Os sintomas mais freqüentes são a dispnéia e dor torácica (LEE; SHAH, 2001). Esta diminuição de oxigênio no sangue oferece condições para mudanças estruturais na albumina humana formando a IMA (LEE et al, 2007). O aumento significativo dos níveis de IMA no soro de pacientes com EP foi de 97,7% , caracterizando a alta especificidade desta nos casos de isquemia. Estes dados

sugerem que os valores da IMA servem como fator de exclusão para EP, evitando com isso, a necessidade de outros diagnósticos mais complexos (TUREDI et al, 2007).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliados neste estudo um total de 36 indivíduos, destes 17 pacientes que realizavam hemodiálise com anemia associada à doença renal crônica (DRC), oriundos dos Hospitais de Caridade e Casa de Saúde, localizados em Santa Maria, RS, Brasil. Dentre os pacientes hemodializados, 11 eram homens, e seis eram mulheres, com idade média de $51,6 \pm 12,8$ anos (entre 38 e 64 anos). Pacientes com diabetes, hepatite viral, alcoólatras, fumantes e soro positivo para HIV, foram excluídos do estudo. Dezenove indivíduos saudáveis foram incluídos no grupo controle. Destes, 10 eram homens, e 9 eram mulheres, com idade média de $43,7 \pm 5,4$ anos (entre 38 e 49 anos). Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, e este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 0109.0.243.000-06.

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa pelo método padrão e posteriormente transferidas para tubos à vácuo Vacutainer® (BD Diagnostics®, USA), com tampa roxa, cinza e vermelha, contendo anticoagulante EDTA, fluoreto de sódio com oxalato de potássio e sem anticoagulante, respectivamente. As amostras foram centrifugadas após uma hora da coleta por 15 minutos à $1000 \times g$, sendo separadas em alíquotas e armazenadas à -20°C por no máximo quatro semanas.

O hematócrito e a hemoglobina foram determinados, nas amostras obtidas com EDTA, pelos métodos padrões no sistema totalmente automatizado PENTRA 120® (ABX Diagnostics, Montpellier, França). A concentração plasmática de lactato, bem como as concentrações séricas de ferro e creatinina foram mensurados pelos métodos padrões no sistema automatizado de química seca VITROS 950® (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA). A albumina foi medida no soro pelo método do verde de bromocresol no sistema automatizado Cobas MIRA® Plus (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland), e a ferritina foi mensurada através de imunoensaio de quimioluminescência no sistema automatizado IMMULITE 2000® (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA).

As dosagens séricas de IMA foram realizadas pelo teste de ligação do cobalto com a albumina no sistema automatizado Cobas MIRA® Plus de acordo com o

método descrito por Fagan et al (2002) e previamente validado (FAGAN et al, 2002; GIDENNE et al, 2004). Noventa e cinco μL do soro do paciente foram pipetados para a cubeta de reação do Cobas MIRA[®] Plus. Cinco μL de solução de cloreto de cobalto à 16,8 mM (CoCl_2) juntamente com 20 μL de tampão barbital (pH 8,6) foram adicionados 25 segundos depois. A mistura amostra/cobalto/tampão foi incubada por 275 segundos para permitir a ligação do cobalto à albumina e lida em comprimento de onda de 500nm. Vinte e cinco μL de ditiotreitol (DDT) 9,7 mM foi adicionado após 25 segundos. O DTT reage com o cobalto livre (não seqüestrado pelo N-terminal) formando um produto corado. A mistura final foi incubada por mais 100 segundos, e lida em 500 nm. Todas as incubações foram a 37°C. O tempo total da dosagem foi de 7,5 minutos. Os resultados da IMA foram expressos em unidades de absorvância (ABSU), conforme descrito previamente (BAR-OR; LAU; WINKLER, 2000; BHAGAVAN et al, 2003).

Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão. Foi empregado o teste de Mann Whitney para avaliar as diferenças entre os grupos. O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a associação entre IMA, lactato, hemoglobina e creatinina, e $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

Os resultados encontrados para os níveis de hematócrito, hemoglobina, ferro e albumina foram menores no grupo com anemia associada à DRC em relação ao grupo controle. Os níveis de ferritina, creatinina e lactato foram maiores no grupo anêmico em relação ao grupo controle, como pode ser observado na Tabela 1. Os níveis de IMA foram mais elevados no grupo de pacientes com anemia associada à DRC ($0,8115 \pm 0,1304$) ABSU, quando comparado com o grupo controle ($0,4951 \pm 0,0393$) ABSU, conforme demonstrado na Figura 1. Foram observadas correlações significativas entre IMA e hemoglobina ($r= -0,3442$, $P=0,0398$), IMA e lactato ($r= 0,4616$, $P=0,0046$), IMA e creatinina ($r= 0,5008$, $P=0,0019$), lactato e hemoglobina ($r= -0,7195$, $P<0,0001$), conforme ilustrado nas Figuras 2, 3, 4 e 5, respectivamente.

Tabela 1. Valores médios e desvios-padrão e variáveis clínicas de pacientes anêmicos e controle.

Variáveis	Controle	Anemia
Hematócrito (%)	$42,68 \pm 1,27$	$30,19 \pm 1,24^c$
Hemoglobina (g/dl)	$14,43 \pm 0,54$	$9,77 \pm 0,40^c$
Ferro ($\mu\text{g/ml}$)	$71,95 \pm 3,95$	$53,82 \pm 3,90^a$
Ferritina (ng/ml)	$83,79 \pm 6,92$	$213,60 \pm 38,13^b$
Albumina (g/dl)	$4,00 \pm 0,06$	$3,17 \pm 0,04^c$
Creatinina (mg/dl)	$0,86 \pm 0,04$	$5,52 \pm 0,37^c$
Lactato (mmol/l)	$1,07 \pm 0,05$	$2,75 \pm 0,29^c$

Os valores estão expressos em média \pm erro padrão (SEM).

^a $P<0,05$, ^b $P<0,01$ e ^c $P<0,001$

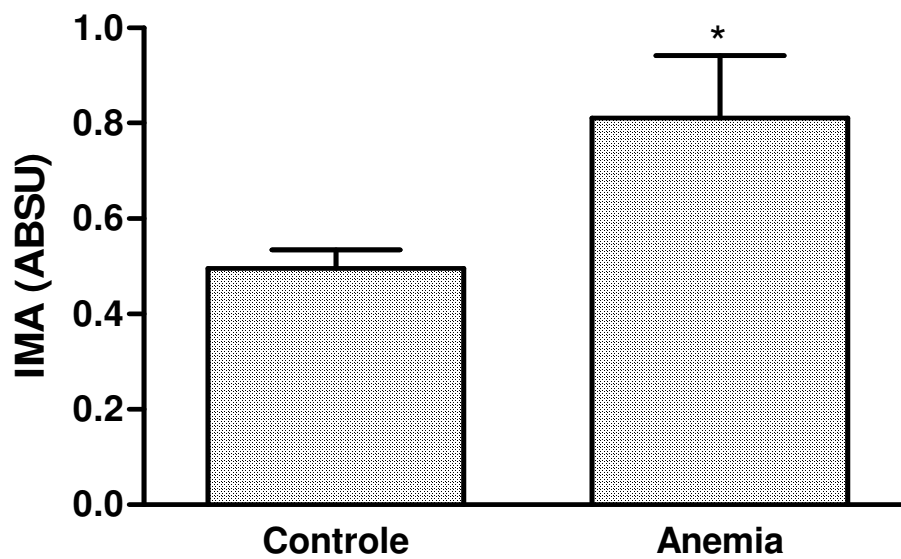


Figura 1. Resultados de IMA, observados nos grupos de pacientes anêmicos e controles ($P < 0.05$).

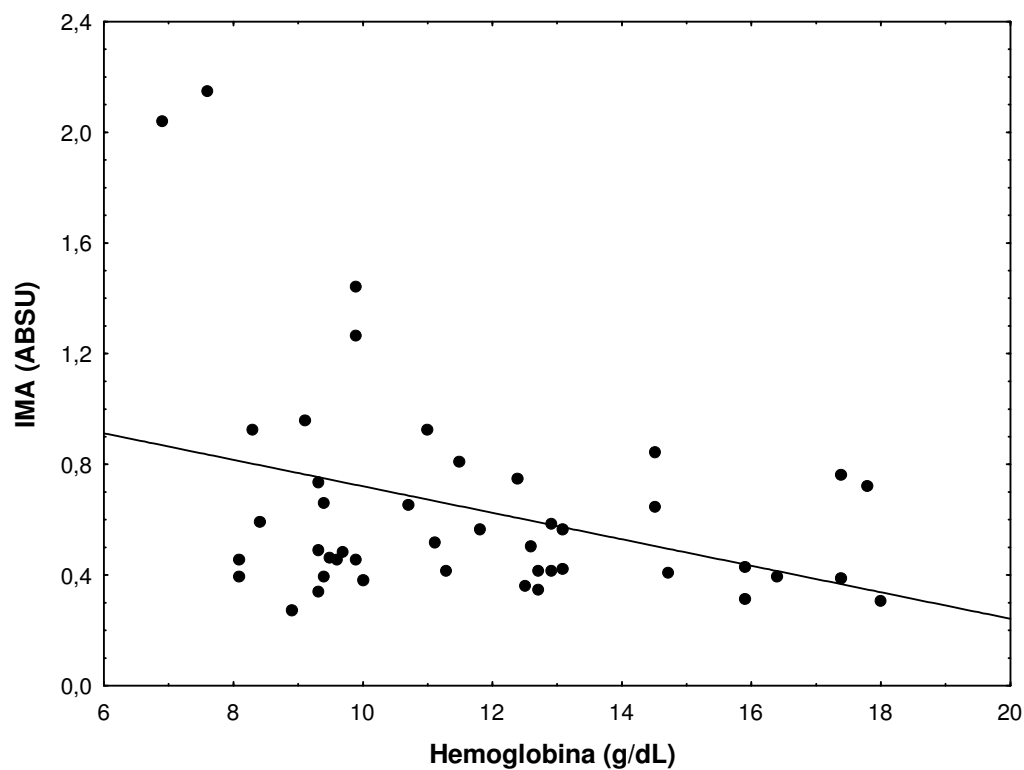


Figura 2. Correlação significativa inversa entre os níveis de IMA e hemoglobina nos pacientes anêmicos e controles ($r = -0,3442$, $P = 0,0398$).

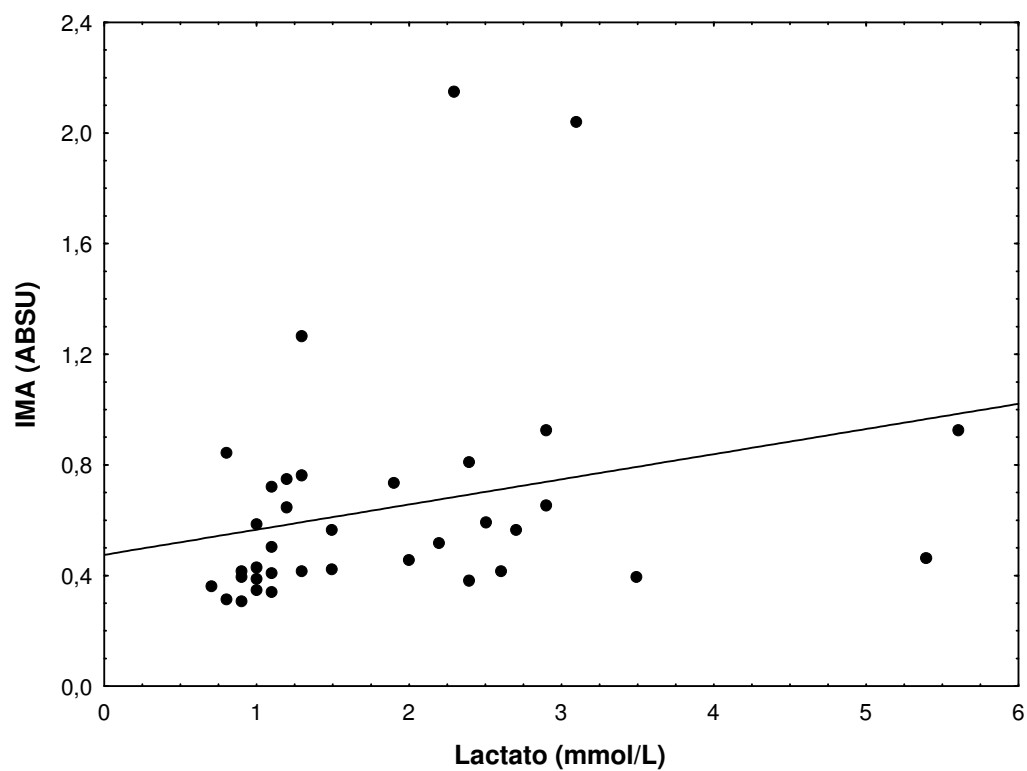


Figura 3. Correlação significativa entre os níveis de IMA e lactato nos pacientes anêmicos e controles ($r= 0,4616$, $P=0,0046$).

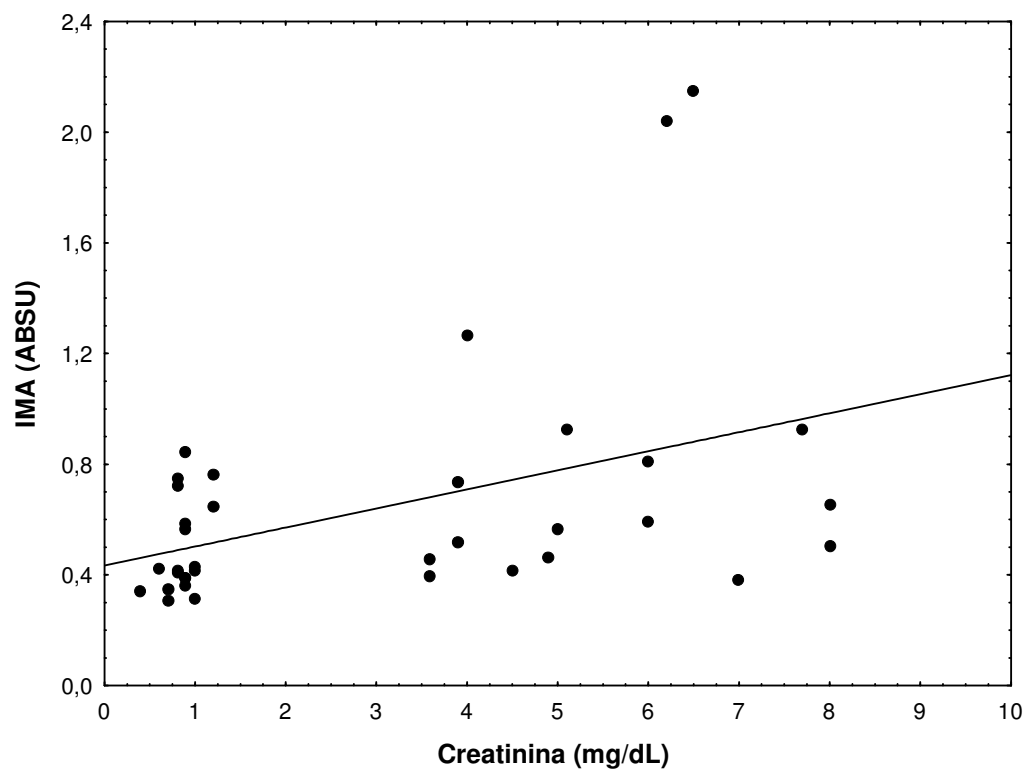


Figura 4. Correlação significativa entre os níveis de IMA e creatinina nos pacientes anêmicos e controles ($r= 0,5008$, $P=0,0019$).

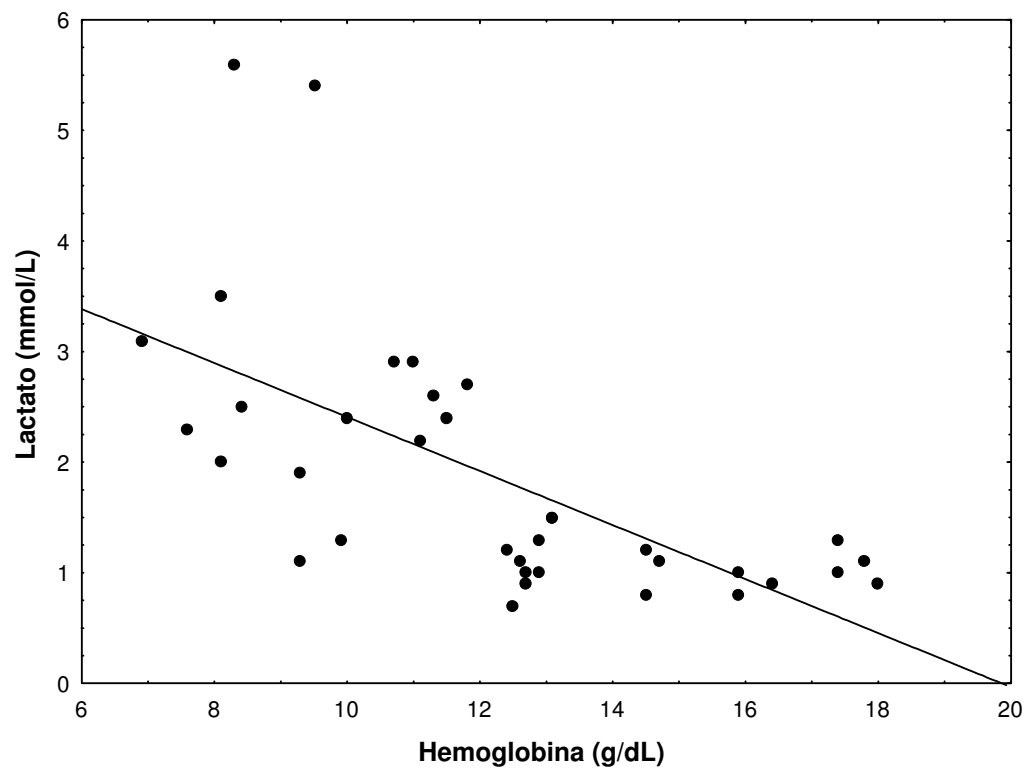


Figura 5. Correlação significativa inversa entre os níveis de lactato e hemoglobina nos pacientes anêmicos e controles ($r = -0,7195$, $P < 0,0001$).

6. DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo mostram que os níveis de IMA e as concentrações de lactato aumentam em pacientes com anemia associada à DRC. Este aumento pode ser atribuído ao estresse oxidativo normalmente observados nestes pacientes e também aos níveis reduzidos de albumina, resultando no aumento da porção de cobalto livre (ROY et al, 2006; ROY; KASKI, 2007). Segundo os autores ocorre geração de EROs que pode modificar a região do N-terminal da albumina e produzir um aumento dos níveis de IMA. Para Valentini et al. (2007) a disfunção renal é acompanhada de estresse oxidativo, que consiste no dano das estruturas biológicas pelas EROs devido a sua geração excessiva e deficiência de mecanismos antioxidantes de defesa. Durak et al. (1994) citam que o dano produzido pela EROs, retiram um átomo de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, iniciando assim, o processo de peroxidação lipídica, principal característica do estresse oxidativo. Este mecanismo causa um aumento da rigidez e deformabilidade das membranas das hemácias, que por sua vez, aumenta a susceptibilidade destas à hemólise ocorrendo assim, uma conseqüente diminuição da hemoglobina. Sharma et al. (2006) recentemente concluíram que o nível da IMA prediz a mortalidade em pacientes com doença renal crônica na fase terminal. Estes pacientes possuem o lado esquerdo ventricular maior, função sistólica diminuída e maior pressão ventricular do lado esquerdo, sendo que estas variações se devem aos mecanismos alternativos para o consumo de oxigênio, como o aumento de batimentos cardíacos para compensar a diminuição dos níveis de hemoglobina na anemia.

A isquemia pode alterar a capacidade de ligação de metais com a albumina circulante, e os mecanismos bioquímicos envolvidos nas alterações *in vivo* desta ligação durante a isquemia e a reperfusão, podem ser a hipóxia, acidose, danos causados por radicais livres, distúrbios no transporte de sódio e cálcio junto à membrana, e exposição de íons ferro e cobre (BERENSHTEIN et al, 1997; BAR-OR; LAU; WINKLER, 2000; CHRISTENSON et al, 2001).

Os três primeiros aminoácidos do N-terminal da albumina são o aspartato, alanina e histidina, sendo este o local amplo e específico para ligação de metais de transição, tais como o cobalto, cobre e níquel, também sendo a região mais

suscetível para a degradação, quando comparada com outras regiões da albumina (BAR-OR; LAU; WINKLER, 2000; CHO et al, 2007;). Entretanto, Mothes; Faller (2007) recentemente sugeriram que os primeiros dois equivalentes de cobalto (Co^{II}) se ligam aos sítios A e B, e somente o terceiro pode se ligar ao N-terminal. Os autores, também, avaliaram que as mudanças estruturais na albumina humana e os subseqüentes baixos níveis de Co^{II} ligante observados na isquemia do miocárdio pode estar relacionado à ligação com ácidos graxos. Recentemente, estudos indicam que os níveis de IMA elevam-se minutos após o início da isquemia no IAM, permanecendo elevados por 6 a 12 horas, porém os marcadores de necrose (CK, CK-MB e a troponina) seus valores elevam-se 6 a 12 horas após o IAM. Esses marcadores são enviados a circulação sangüínea somente após lesão celular irreversível, entretanto quando se trata de episódios reversíveis de isquemia, estes não se elevam no sangue (GIDENNE et al, 2004).

Os níveis de IMA no sangue são indicados para exclusão de síndromes coronarianas agudas em pacientes apresentando dor torácica ou outros sintomas indicativos de origem cardíaca, devido à alta sensibilidade, e também alto valor preditivo negativo, entretanto, tem uma baixa especificidade e um baixo valor preditivo positivo, quando comparada com o eletroencefalograma, CK, CK-MB e a troponina, devendo com isso, ser usada em conjunto com estes marcadores para o diagnóstico das síndromes coronarianas agudas. Este procedimento reduz substancialmente a admissão inapropriada de pacientes com baixo risco nos serviços de emergência dos hospitais (KUTZ et al, 2007).

A disfunção renal está associada à perda da função do rim com o aumento dos níveis de creatinina no sangue, entretanto, esta elevação ocorre somente quando há dano de 70% dos néfrons funcionais, portanto não é um teste adequado para detectar uma doença renal no seu estágio inicial, sendo que a melhor avaliação é dada pela DCE. Altas ou baixas concentrações de albumina podem afetar a dosagem da IMA, produzindo valores mais baixos ou mais altos, respectivamente, mesmo dentro do intervalo de referência. A razão para esta interferência está relacionada ao principio do método, ou seja, quanto menos albumina circulante no sangue, menos cobalto se liga a ela, permitindo que uma maior quantidade de cobalto reaja com o DTT e vice-versa. Lee et al. (2007); Lippi et al. (2007) recentemente avaliaram fórmulas para o ajuste da IMA pela albumina no soro, mas estas ainda não foram validadas para pacientes com DRC. Neste estudo, não

observamos diferença significativa dos níveis de IMA entre o grupo controle e o grupo com anemia associada à DRC após o ajuste destes valores pela albumina. Entretanto, estudos extras são aconselháveis para tornar mais eficiente o diagnóstico. O aumento dos níveis de IMA em pacientes anêmicos associados à DRC pode ser atribuído também à hipóxia discreta ocasionada devido aos baixos níveis de hemoglobina, e esta hipóxia pode ser responsável pela alteração na ligação da albumina aos metais durante a anemia. A redução dos níveis de hemoglobina pode afetar o transporte de oxigênio junto aos tecidos. Outra causa determinante poderia ser também, a diminuição dos níveis de albumina, observados neste grupo (ROACH et al, 1999; SALTIN et al, 1986).

Nossos resultados confirmam estudos anteriores que relataram um aumento de níveis de lactato na anemia. A oxigenação reduzida pelos baixos níveis de hemoglobina resulta em hipóxia, a qual aciona o metabolismo anaeróbico (OHIRA et al, 1983; CEYHAN; OZALP; ALTAY,1988; HAALAND et al, 1996). O lactato é o produto final da glicólise anaeróbica e altas concentrações deste no sangue podem indicar hipóxia tecidual nos casos de choque traumático, séptico, hipovolêmico ou cardiogênico.

A anemia está relacionada à diminuição da tensão de oxigênio. Os níveis elevados de desidrogenase láctica-5 encontrados em pacientes anêmicos, certamente estão em conformidade com o metabolismo anaeróbico. Possivelmente esta elevação é conseqüência da oxigenação reduzida, provocada pelos baixos níveis de hemoglobina (KOUKOURAKIS et al, 2006).

O lactato e a hemoglobina apresentaram a melhor correlação neste estudo, observou-se uma correlação negativa significativa. A correlação inversa entre o lactato e a hemoglobina na anemia foi previamente relatada, e a hipóxia causada pelo quadro anêmico pode ser a responsável pela elevação dos níveis de lactato (CEYHAN; OZALP; ALTAY, 1988; HAALAND et al, 1996;). Ohira et al. (1983) relataram que os níveis de lactato foram significativamente elevados no sangue de ratos com anemia por deficiência de ferro, elemento este, que é fundamental na estrutura da hemoglobina, pois o oxigênio se liga ao ferro para ser transportado aos tecidos, portanto esta anemia induz uma maior produção de lactato seguida de um aumento da atividade da LDH.

Embora o lactato seja um marcador pouco sensível para a isquemia, nossos dados indicam que seus níveis são mais elevados no grupo de anêmicos associados

à DCR, quando comparados com os níveis da IMA. Entretanto, outros estudos precisam ser feitos para entendermos os mecanismos que levam ao aumento dos níveis de IMA e lactato na anemia e em outras condições clínicas associadas à isquemia, e também avaliar o valor da IMA como uma ferramenta eficiente para o diagnóstico de patologias isquêmicas.

7. CONCLUSÃO

- Os níveis de albumina, hematócrito, hemoglobina e ferro sérico são menores em pacientes com anemia associada à DRC, entretanto os níveis de creatinina e ferritina são elevados.
- Os pacientes anêmicos apresentaram níveis mais elevados de IMA e lactato, sendo que o lactato apresentou uma elevação mais significativa.
- A IMA e o lactato apresentaram correlações inversas significativas com a hemoglobina, sendo a correlação do lactato a mais expressiva.
- A IMA apresentou uma correlação significativa com os níveis de lactato e creatinina, evidenciando que existe uma associação entre a perda da função renal com a elevação da IMA.

8. REFERÊNCIAS

ADORNO, E.V.; COUTO, F.D.; MOURA NETO, J.P.; et al. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cad S Pública**. v. 21(1): 292-298, 2005.

APPLE, F. S.; QUIST, H. E.; OTTO, A. P.; et al. Release characteristics of cardiac biomarkers and ischemia-modified albumin as measured by the albumin cobalt-binding test after a marathon race. **Clin Chem**. v. 48(7): 1097-1100, 2002.

ASTOR, B.C.; MUNTNER, P.; LEVIN, A.; et al. Association of kidney function with anemia: The Third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994). **Arch Intern Med** . v. 162: 1401-1408, 2002

BANDEIRA, F.M.; LEAL, M.C.; SOUZA, R.R.; et al. Características de recém-nascidos portadores de hemoglobina S detectados através da triagem em sangue de cordão umbilical. **J Pediatr**. v. 75: 167-171, 1999.

BAR-OR, D.; LAU, E.; WINKLER, J. V. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. **J Emerg Med**. v. 19:311-315, 2000.

BERENSHTEIN, E.; MAYER, B.; GOLDBERG, C.; et al. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. **J Mol Cell Cardiol**. v. 29:3025-3034, 1997.

BERNARD, J.; LÉVY, J. P.; CLAVEL, J. P.; et al. **Manual de hematologia**. Rio de Janeiro: Masson do Brasil, 1989. 218 p. il., tab. Tradução de: Abrégé d'hématologie. Traduzido sob a supervisão de Hildebrando Monteiro Marinho. Participaram da autoria: Jean-Paul Lévy, Jean-Pierre Clauvel, Jean-Didier Rain, Bruno Varet. ISBN 85-85005-01-7.

BERNE, R. M.; LEVY, M. N. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. 3ed. Guanabara Koogan, 1996.

BETSY, L.; NIKO, K.; TOMÁS, W. Iron deficiency in infancy: applying a physiologic framework for prediction. **Am J. Clin Nutr.** v. 84(6): 1412-1421, 2006.

BHAGAVAN, N. V.; LAI, E. M.; RIOS, P. A.; et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. **Clin Chem.** v. 49:581-585, 2003.

BIEBER, I. I. Carnitine. **Ann Ver Biochem.** v. 57: 261-283, 1988.

BORDERIE, D.; ALLANORE, Y.; MEUNE, C.; et al. High ischemia-modified albumin concentration reflects oxidative stress but not myocardial involvement in systemic sclerosis. **Clin Chem.** v. 50(11): 2190-2193, 2004.

BRAGA, J. A. P. ; MEZIARA, H. D. ; FISBERG, M. Anemia carencial – aspectos clínicos e laboratoriais. **Laes&Haes.** v. 95:46-56, 1995.

BRASS, E. P.; HOPPEL, C. I. Relationship between acid-soluble carnitine and coenzyme a pools in vivo. **Biochem J.** v. 190: 495-504, 1980.

BUKANAY, S.M.; DAINER, E.; CLAIR, B.; et al. Mortality in sickle cell patients on hydroxyurea therapy. **Blood.** v. 105(2): 545-547, 2005.

CAVALCANTE, T. A. A Medula Óssea. Rio de Janeiro, 2005. Disponível em: <http://www.hemonline.com.br/htm> . Acesso em: 06 agost. 2006

CEYHAN, M.; OZALP, I.; ALTAY, C. High levels of lactate pyruvate and alanine in anemic children. **Clin Pediatr.** v. 27:206-209, 1988.

CHRISTENSON, R. H.; DUH, S. H.; SANHAI, W. R.; et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. **Clin Chem.** v. 47:467-470, 2001.

CHO, D. K.; CHOI, J. O.; KIM, S. H.; et al. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. **Coron Art Disease**. v.18(2):83-87,2007.

DUBB, L. L.; RAHMANTO, S. Y.; RICHARDSON, R. D. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in cell Biology**. v. 17(2): 93-100, 2006.

DURAK, I.; AKYOL, O.; BASESME, E.; et al. Reduced erythrocyte defense mechanism against free radical toxicity in patients with chronic renal failure. **Nephron**. v. 66(1): 76-80, 1994.

EATON, W. A.; HOFRICHTER, J. Hemoglobin S gelation and sickle cell disease. **Blood**. v. 70: 1245-1266, 1987.

EISENSTAEDT, R.; PENNINX, B. W. J. H.; WOODMAN, R. C. Anaemia in the elderly: Current understanding and emerging concepts. **Elsevier**. v. 20: 213-226, 2006.

ECKARDT, K. U. Anaemia in end-stage renal disease: pathophysiological considerations. **Nephrol Dial Transplant**. v.16(Suppl 7): 2-8, 2001.

EKNOUAN, G. Chronic kidney disease definition and classification: the quest for refinements. **Kidney Int**. v. 72: 1183-1185, 2007.

EL NAHAS, A. M.; BELLO, A. K. Chronic kidney disease: the global challenge. **Lancet**. v. 365:331-340, 2005.

ESCHBACH, J. W.; ADAMSON, J. W.; Anemia of end-stage renal disease (ESRD). **Kidney Int**. v. 28:1-5, 1985.

FAGAN, G.J.; WAYMENT, H.; MORRIS, D.L.; et al. The albumin cobalt binding test: analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). **J of Clin Ligand Ass**. v. 25:178-187, 2002.

FISHBANE, S. Iron management in Nondialysis-Dependent CKD. **Am J Kidney Dis.** v. 49(6): 736-743, 2007.

FAILACE, R. **Hemograma: manual de interpretação.** 3ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1995.

GAZE, D. C.; CROMPTON, L.; COLLINSON, P. Ischemia-modified albumin concentrations should be interpreted with caution in patients with low serum albumin concentrations. **Med Princ Pract.** v.15:322-324, 2006.

GAW, A.; COWAN, R.A.; O'REILLY, D.S.J.; et al. **Bioquímica Clínica: um texto ilustrado em cores.** 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GIDENNE, S.; CEPPA, F.; FONTAN, E.; et al. Analytical performance of the albumin cobalt binding (ACB) test on the Cobas MIRA Plus analyzer. **Clin Chem Lab Med.** v. 42:455-461, 2004.

GIROT, R.; BEGUE, P. Sickle cell disease in childhood in 2004. **Bull Acad Natl Med.** v. 188(3): 491-505, 2004.

GREGG, S.G.; MAZZEO, R. S.; BUDINGER, T. F.; et al. Acute anemia increases lactate production and decreases clearance during exercise. **J Appl Physiol.** v. 67: 756-764, 1989.

HAALAND, K.; KOFSTAD, J.; APRICENA, F.; et al. Haemoglobin is inversely related to plasma lactate and rate in the newborn piglet. **Biol Neonate.** v. 69:350-356, 1996.

HANNAN, R. L. ; YBARRA, M. A. ; WHITE, J. A. ; et al. Patterns of lactate value after congenital heart surgery and timing of cardiopulmonary support. **Ann Thorac Surg.** v. 80: 1468-1474, 2005.

HENRY, J. B. **Diagnósticos Clínicos e Conduta Terapêutica por Exames Laboratoriais.** 16ª ed. São Paulo: Manole, 1989.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**. v. 358: 209-215, 1992.

HIATT, W. R.; REGENSTEINER, J. G.; WOLFEL, E. E. Carnitine and acylcarnitine metabolism during exercise in humans. Dependence on skeletal muscle metabolic state. **J Clin Invest**. v. 84: 1167-1173, 1989.

KATZUNG, B. G. **Farmacologia Básica e Clínica**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

KERR, P. G. Renal anaemia: Recent developments, innovative approaches and future directions for improved management. **Nephrology**. v. 11: 542-548, 2006.

KOUKOURAKIS, M. I.; GIATROMANOLAKI, A.; POLYCHONIDIS, A.; et al. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. **Cancer Sci**. v. 97:582-588, 2006.

KUMAR, Y.; ABBAS, A. K. ; FAUSTO, N. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. 7 ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2005.

KUTZ, K.; VOELKER, R.; ZDUNEK, D.; et al. Effect of stress-induced reversible ischemia on serum concentrations of ischemia-modified albumin natriuretic peptides and placental growth factor. **Clin Res Cardiol**. v. 96:152-159, 2007.

LEE, L. C.; SHAH, K. Clinical manifestation of pulmonary embolism. **Emerg Med Clin North Am**. v. 19: 925-942, 2001.

LEE, M. R.; ANDREW, T. L.; HANS, C. H.; et al. Effect of inspiratory muscle work on peripheral fatigue of locomotor muscles in healthy humans. **J Physiol**. v. 571(2): 425-439, 2006.

LEE, Y.W.; KIM, H. J.; CHO, Y. H.; et al. Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. **Clin Chim Acta** . v. 384(1-2): 24-27, 2007.

LENNON, D. I.; SHRAGO, E.; MADDEN, M. Carnitine status plasma lipid profiles and exercise capacity of dialysis patients: effects of a submaximal exercise program. **Metabolism**. v. 35: 728-735, 1986.

LIPPI, G.; MONTAGNANA, M.; SALVAGNO, G. L.; et al. Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. **Clin Chem Lab Med**. v. 45:261-262, 2007.

LORENZI, T. F. **Atlas de hematologia: clínica hematológica ilustrada**. 1ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

MADONE, F.; LOWRIE, E. G.; BRUGNARA, C.; et al. Anemia in hemodialysis patients: variables affecting this outcome predictor. **J Am Soc. Nephrol**. v. 8(12):1921-1929, 1997.

MAGUIRE, O. C.; O'SULLIVAN, J. ; RYAN, J. & CUNNINGHAM, K. Evaluation of the albumin cobalt binding (ACB) assay for measurement of ischaemia-modified albumin (IMA) on the Beckman Coulter LX-20. **Ann Clin Biochem**. v. 43: 494-499, 2006.

MICHAEL, K.; JANNI, A.; MARIA, R.; et al. Lactate and force production in skeletal muscle. **J Physiol**. v. 562(2): 521-526, 2005.

MIGUEL, A.; LINARES, M.; PEREZ, A. Evidence of an increased susceptibility to lipid peroxidation in red blood cells of chronic renal failure patients. **Nephron**. v. 50(1): 64-61, 1988.

MIRANDA, A. S. Anemia Ferropriva e Estado Nutricional de Crianças com Idade de 12 a 60 Meses do Município de Viçosa, Minas Gerais. **Rev Nutr**. v.16 (2):163-169, 2003.

MORROW, D. A.; DE LEMOS, J. A.; SABATINE, M. S.; et al. The search for a biomarker of cardiac ischemia. **Clin Chem**. v. 49(4): 537-539, 2003.

MOTA, V. T. **Bioquímica Clínica: princípios e interpretação**. 3ed Porto Alegre. Editora Médica Missau, 2000.

MOTHES, E.; FALLER, P. Evidence that the principal Co – binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. **Biochemistry**. v. 46: 2267-2274, 2007.

NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S. Molecular aspects for sickle cell anemia. **J Bras Patol Med Lab**. v. 39(1): 51-56, 2003.

OFSTHUM, N. The Effects of higher hemoglobin levels on mortality and hospitalization in hemodialysis patients. **Kidney Int**. v. 63: 1908-1914, 2003.

OHIRA, Y.; CHEN, C. S.; HEGENAUER, J.; et al. Adaptations of lactate metabolism in iron-deficient rats. **Proc Soc Exp Biol Med**. v. 173:213-216, 1983.

PERLMAN, R. L.; FINKELSTEIN, F. O.; LIU, L.; et al. Quality of life in chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional analysis in the Renal Research Institute – CKD study. **Am J Kidney Dis**. v. 45:658-666, 2005.

PIERACCI, F. M.; BARIE, P. S. Diagnosis and management of iron-related anemias in critical illness. **Crit Care Med** . v. 34(7): 1898-1905, 2006.

POLLITT, E. The Developmental and Probabilistic Nature of the Functional Consequences of Iron – Deficiency in Children. **J Nutr**. v. 131: 669-675, 2001.

RAVEL R. **Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

RICANATI, E. S.; TSEMG, K.; HOPPEL, C. I. Abnormal fatty acid utilization during prolonged fasting in chronic uremia. **Kidney Int**. v. 32(Suppl 22): 145-148, 1987.

ROACH, R. C.; KOSKOLOU, M. D.; CALBET, J. A.; et al. Arterial O₂ content and tension in regulation of cardiac output and leg blood flow during exercise in humans. **Am J Physiol.** v. 276: 438-445, 1999.

ROCHA, G. K. A. et al. Prevalência de Anemia em Crianças e Adolescentes Portadores de Enteroparasitoses. **News Lab.** v. 12 (65): 172-188, 2004.

ROY, D.; KASKI, J. C. Ischemia-modified albumin: the importance of oxidative stress. **J Am Coll Cardiol.** v. 49: 2375-2376, 2007.

ROY, D.; QUILES, J.; GAZE, D. C.; et al. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. **Heart.** v. 92: 113-114, 2006.

ROY, D.; QUILES, J.; SHARMA, R.; et al. Ischemia-modified albumin concentrations in patients with peripheral vascular disease and exercise-induced skeletal muscle ischemia. **Clin Chem.** v. 50:1656-1660, 2004.

SALTIN, B.; KIENS, B.; SAVARD, G.; et al. Role of haemoglobin and capillarization for oxygen delivery and extraction in muscular exercise. **Acta Physiol Scand.** v. 128: 21-32, 1986.

SARA, F.; HARDY-DESSOURCES, D.; VOLTAIRE, B.; et al. Lactic response in sickle cell trait carriers in comparison with subjects with normal hemoglobin. **Clin J Sport Med.** v. 13(2): 96-101, 2003.

SBAROUNI, E.; GEORGIADOU, P.; THEODORAKIS, G. N.; et al. Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. **J Am Coll Cardiol.** v. 48:2482-2484, 2006.

SHARMA, R.; GAZE, D.C.; PELLERIN, D.; et al. Ischemia-modified albumin predicts mortality in RSRD. **Am J Kidney Dis.** v. 47:493-502, 2006.

SILLA, L.M.R. Doença falciforme: um grave e desconhecido problema de saúde pública no Brasil. **J Pediatr.** v. 75: 145-146, 1999.

SINHA, M.K.; ROY, D.; GAZE, D.C.; et al. Role of "ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. **Emerg Med J.** v. 21:29-34, 2004.

STEINBERG, M.H. Predicting clinical severity in sickle cell anaemia. **Br J Haematol.** v. 129: 465-481, 2005.

STOLTZFUS, R. J. Iron deficiency: global prevalence and consequences. **Food Nutr Bull.** v. 24(Suppl 4): 99-103, 2003.

SWAMINATHAN, R.; MAJOR, P.; SNIEDER, H.; et al. Serum creatinina and fat-free mass (lean body mass). **Clin Chem.** v. 46(10), 2000.

TUREDİ,S.; GUNDUZ, A.; MENTESE, A.; et al. Value of ischemia-modified albumin in the diagnosis of pulmonary embolism. **Am J of Emerg Med.** v. 25: 770-773, 2007.

VALENTINI, J.; SCHMITT, G. C.; GROTTTO, D.; et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinatase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. **Clin Biochem.** v. 40: 591-594, 2007.

VERRASTRO, T.; LORENZI, T. F.; WENDEL NETO, S. **Hematologia e hemoterapia: Fundamentos de morfologia, fisiologia, patologia e clínica.** 1ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

WINTROBE, M. M. ; LUKENS, J. L. ; LEE, G. R. A. **Abordagem do paciente com Anemia.** In: LEE, G.R. et al. **Wintrobe: Hematologia Clínica.** 1 ed. São Paulo: Manole, 1998.

WISH, J. B.; COYNE, D. W. Use of erythropoiesis-stimulating agents in patients with anemia of chronic kidney disease: overcoming the pharmacological and

pharmacoeconomic limitations of existing therapies. **Mayo Clin Proc.** v. 82: 1371-1380, 2007.

WORSTER, A.; DEVEREAUX, P. J.; HEELS-ANSDELL, D.; et al. Capability of ischemia-modified albumin to predict serious cardiac outcomes in the short term among patients with potential acute coronary syndrome. **CMAJ.** v. 173(13): 1685-1690, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e prática.** São Paulo: Atheneu, 2001.

ANEXO

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO NO *JOURNAL OF CLINICAL LABORATORY ANALYSIS*

Evaluation of Ischemia-Modified Albumin in Anemia Associated to Chronic Kidney Disease

**Luiz Carlos Cichota,^{1,2} Rafael Noal Moresco,^{1,3} Marta Maria Medeiros
Frescura Duarte,⁴ and José Edson Paz da Silva,^{1,3,*}**

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

²Departamento de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, RS, Brazil.

³Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Departamento de Ciências da Saúde, Universidade Luterana do Brasil, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Avenida Roraima 1000, Prédio 26, Sala 216, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brazil.

Tel.: +55 55 32208464; fax: +55 55 32208018

E-mail: pazdasilva@smail.ufsm.br (José Edson Paz da Silva)

Short version of the title: IMA in anemia of chronic kidney disease

Keywords: ischemia-modified albumin; lactate; hemoglobin; anemia; ischemia.

ABSTRACT

Chronic kidney disease (CKD) is highly prevalent, with increasing numbers of patients affected by the disease world-wide, and anemia is a common finding in patients with CKD. Anemia impacts negatively on cardiovascular disease, exercise capacity and quality of life, resulting in a significant mortality and morbidity. The aim of this study was to evaluate the levels of ischemia-modified albumin and lactate in patients with established anemia associated to CKD and its correlations with hemoglobin levels. Hematocrit, hemoglobin, iron, ferritin, albumin, creatinine, lactate and IMA were measured in 17 patients with established anemia associated to CKD and 19 controls by standard methods. The results of hematocrit, hemoglobin, iron and albumin were lower in anemia group than control group. Ferritin, creatinine and lactate levels were higher in anemia of CKD group than control group. IMA increase in anemia group (0.8115 ± 0.1304) ABSU compared to control (0.4951 ± 0.0393) ABSU. Significant correlations between IMA and lactate, IMA and hemoglobin, IMA and creatinine, and hemoglobin and lactate were observed. IMA and lactate increase during anemia and this elevation could be associated to hypoxia due to low hemoglobin levels. However, our data suggest that lactate is more sensitive to anemia compared to IMA.

INTRODUCTION

Chronic kidney disease (CKD) is highly prevalent, with increasing numbers of patients affected by the disease world-wide (1). Anemia is a common complication that contributes to the burden of disease associated with CKD, and it impacts negatively on cardiovascular disease, exercise capacity and quality of life, resulting in a significant mortality and morbidity in patients with CKD (2-5). Anemia is currently defined by the World Health Organization (WHO) as a hemoglobin (Hb) level <13 g/dL in men and <12 g/dL in women (6). Iron deficiency anemia (IDA) is the most common anemia and it affects an estimated 1 to 2 billion people worldwide. In developing countries, over 50% of pregnant women are anemic, as are 46% to 66% of children under 4 years, with half attributed to iron deficiency (7,8).

Human serum albumin, a single chain of 585 amino acids, consists of three structurally homologous, largely helical domains (I, II, and III), and each domain consists of two subdomains, A and B (9). The first three amino acids in the N-terminus, Asp-Ala-His, is a specific binding site for transition metals such as cobalt (II), copper (II), and nickel (II), and the most susceptible region for degradation compared with other regions of albumin. Ischemia, hypoxia, acidosis, and free radical formation can transiently alter the ability of the residues to bind free metal atoms (10-13). On the basis of these biochemical changes, Bar-Or et al. (13) described a rapid colorimetric assay method measuring ischemia-induced alterations of the binding capacity of human serum albumin to exogenous cobalt. Ischemia-modified albumin (IMA) has been shown to be a rapidly rising and sensitive biochemical marker especially for the diagnosis of myocardial ischemia (13-15). Ceyhan et al. (16) reported a negative linear correlation between lactate levels and hemoglobin values in anemic children, and hypoxia associated with anemia could be responsible for the higher levels of lactate. Therefore, we reasoned that IMA and lactate measurement could be useful for the evaluation of hypoxia associated to lower levels of hemoglobin in anemia. The aim of this study was to evaluate the levels of IMA and lactate in patients with established anemia associated to CKD and its correlations with hemoglobin levels.

MATERIALS AND METHODS

We investigated 17 patients submitted to hemodialysis with established anemia associated to chronic kidney disease (CKD) from *Caridade* and *Casa de Saúde* Hospitals, located in Santa Maria, RS, Brazil. Eleven were men, and six were women, and their age was 51.6 ± 12.8 years (range 29 to 77 years). Patients with alcoholism, smoking, diabetes, viral hepatitis and HIV were excluded of this study. Nineteen healthy subjects were included in the control group. Ten were men, and nine were women, and their age was 43.7 ± 5.4 years (range 37 to 55 years). All patients gave written informed consent, and this study protocol was approved by the institutional ethics committee (number 0109.0.243.000-06). Blood samples were collected by venous puncture into purple top, gray top or red top Vacutainer[®] (BD Diagnostics, USA) tubes containing EDTA, sodium fluoride and potassium oxalate, or no anticoagulant, respectively. Specimens were routinely centrifuged within 1 h of collection for 15 min at 1000xg, and an aliquot of serum samples were stored at -20°C for a maximum of 4 weeks to IMA measurement.

Hematocrit and hemoglobin were measured in whole blood collected in EDTA tubes by use of standard methods with the fully automated PENTRA 120[®] (ABX Diagnostics, Montpellier, France) system. Plasma lactate and serum levels of iron and creatinine were measured by use of standard methods with the fully automated VITROS 950[®] (Ortho-Clinical Diagnostics, Rochester, NY, USA) dry-chemistry system. The serum levels albumin were measured by bromcresol green method in Cobas MIRA[®] Plus (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) analyzer, and serum ferritin were measured by use of a chemiluminescence immunoassay in IMMULITE 2000[®] (Diagnostics Products Corporation, Los Angeles, CA, USA) system.

Serum IMA was measured by the albumin cobalt binding test on a Cobas MIRA[®] Plus analyzer according to the method described by Fagan et al. (12) and validated in previous studies (12,17). Ninety-five μL of patient serum is pipetted to the reaction cuvette on the

Cobas MIRA[®] Plus analyzer. Five μL of a 16.8 mM CoCl_2 solution chased with 20 μL of barbital buffer (pH 8.6) is added 25 seconds later. The sample/cobalt/buffer mixture is incubated for 275 seconds to allow binding of cobalt to albumin then a blank read optical measurement is made at 500 nm. Twenty-five μL of 9.7 mM dithiothreitol (DTT) is added 25 seconds later. DTT reacts with unbound (non N-terminal sequestered) cobalt to form a colored product. The final reaction mixture is incubated for an additional 100 seconds and read at 500 nm. All incubations are at 37°C. Total assay time once the sample is pipetted is 7.5 minutes. IMA results were expressed in absorbance units (ABSU) as described previously (13,15).

Data were expressed as mean \pm standard errors (SEM). Mann Whitney test was used to evaluate the difference between groups. Spearman rank correlation was used to evaluate the associations between IMA, lactate, hemoglobin and creatinine, and $P < 0.05$ was considered statically significant.

RESULTS

We evaluated 36 patients in this study, and the levels of hematocrit, hemoglobin, iron and albumin were lower in anemia of CKD group than control group. Ferritin, creatinine and lactate levels were higher in anemia group than control group, as shown in Table 1. The levels of IMA were elevated in anemia associated to CKD group (0.8115 ± 0.1304) ABSU compared to control group (0.4951 ± 0.0393) ABSU, as indicated in Figure 1. We also observed significant correlations between IMA and hemoglobin ($r = -0.3442$, $P = 0.0398$), IMA and lactate ($r = 0.4616$, $P = 0.0046$), IMA and creatinine ($r = 0.5008$, $P = 0.0019$), and lactate and hemoglobin ($r = -0.7195$, $P < 0.0001$), as shown in the Fig. 2.

..... Please add the **Table 1** here

..... Please add the **Figure 1** here

..... Please add the **Figure 2** here

DISCUSSION

The results of the present study indicate that IMA levels and lactate concentrations increase in patients with anemia associated to CKD. Sharma et al. (18) recently reported that IMA level predicts mortality in patients with end-stage renal disease, and patients with elevated IMA levels have larger left ventricular size, decreased systolic function, and greater estimated left ventricular filling pressures. Ischemia may alter the metal binding capacity of circulating serum albumin, and biochemical mechanisms involved in the in vivo alterations to metal-albumin binding during either ischemia or reperfusion may include hypoxia, acidosis, free radical damage, membrane energy-dependent sodium and calcium pump disruptions, and free iron and copper ion exposure (13,19,20). The first three amino acids in the N-terminus, Asp-Ala-His, is a specific binding site for transition metals and the most susceptible region for degradation compared with other regions of albumin (10-13). However, Mothes et al. (21) recently suggested that the first two equivalents of Co^{II} bind to sites A and B, and only the third may be bound to the N-terminal site. They also speculate that the structural changes in human serum albumin and subsequent lower levels of Co^{II} binding in myocardial ischemia could be linked to fatty acid binding.

Renal failure is associated to kidney function loss with the increase of serum creatinine, and it is accompanied by oxidative stress, which consists in the damage of biological structures by reactive oxygen species due to their excessive generation and impaired efficiency of antioxidant defense mechanisms (22). The increase of IMA levels in patients with anemia associated to CKD could be attributed to increase of oxidative stress normally observed in patients with chronic renal failure, and also to decrease of albumin levels observed and the resultant increase in the nonbound portion of cobalt. Generation of reactive oxygen species (ROS) can transiently modify the N-terminal region of albumin and to produce an increase in IMA levels (23,24). Some authors (24,25) reported that ROS generation in vitro cause structural changes in a synthetic N-terminus tetrapeptide, an octapeptide, and human albumin with loss of Co^{2+} binding capacity. High or low albumin

concentrations may affect IMA testing, producing lower or higher values, respectively, even within the reference interval. Some authors (26,27) recently reported formulas for the adjustment of IMA by serum albumin, but these were not still validated in any way for chronic kidney disease patients. The increase of IMA levels in anemic patients could be attributed also to mild hypoxia due to low hemoglobin levels, and this hypoxia is responsible for the alteration in metal-albumin binding during anemia. The reduction of hemoglobin levels could change the tissue oxygen delivery. There are reports suggesting a role for hemoglobin-induced variations in arterial O₂ content to play a role as well (28,29).

Our results confirm previous studies that reported the increase of lactate levels in anemia (16,30-32). Lactate is the end product of the anaerobic glycolysis and high blood lactate concentration can indicate tissue hypoxia in trauma or septic, hypovolemic or cardiogenic shock. Anemia has been implicated in the decreased oxygen tension. The high lactate dehydrogenase-5 levels found in anemic patients are certainly in accordance with the switch-on of anaerobic metabolism, presumably a result of reduced oxygenation offered by the low hemoglobin levels (33). Lactate and hemoglobin showed the best relationship in this study, with a significant negative correlation. The inverse correlation between lactate and hemoglobin levels in anemia was previously reported, and the hypoxia caused by anemia could be responsible for the higher levels of lactate (16,30). Ohira et al. (32) showed that lactate levels were significantly elevated in whole blood and plasma from iron-deficient anemic rats, and iron-deficiency anemia induces an elevation of lactate production following an increase in total LDH activity and change in LDH isoenzyme patterns.

In summary, we have shown that IMA and lactate increase during anemia and this elevation could be associated to hypoxia due to low hemoglobin levels. Although lactate is an insensitive marker of ischemia, our data indicate that it is more sensitive to anemia compared to IMA. However, further epidemiological studies are required to understand the mechanisms leading to increase of IMA and lactate levels in anemia and other different clinical conditions associated to ischemia, and also to evaluate IMA value as a tool in the diagnosis of diseases.

REFERENCES

1. El Nahas AM, Bello AK. Chronic kidney disease: the global challenge. *Lancet* 2005;365:331-40.
2. Hsu CY. Epidemiology of anemia associated with chronic renal insufficiency. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2002;11:337-41.
3. Kerr PG. Renal anaemia: recent developments, innovative approaches and future directions for improved management. *Nephrology* 2006;11:542-48.
4. Perlman RL, Finkelstein FO, Liu L, et al. Quality of life in chronic kidney disease (CKD): a cross-sectional analysis in the Renal Research Institute - CKD study. *Am J Kidney Dis* 2005;45:658-66.
5. Eschbach JW, Adamson JW. Anemia of end-stage renal disease (ESRD). *Kidney Int* 1985;28:1-5.
6. Eisenstaedt R, Penninx BW, Woodman RC. Anemia in the elderly: current understanding and emerging concepts. *Blood Rev* 2006;20:213-226.
7. Lozoff B, Georgieff MK. Iron deficiency and brain development. *Semin Pediatr Neurol* 2006;13:158-165.
8. Stoltzfus RJ. Iron deficiency: global prevalence and consequences. *Food Nutr Bull* 2003;24(4 Suppl):S99-103.
9. He XM, Carter DC. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature* 1992;358:209-215.
10. Cho DK, Choi JO, Kim SH, et al. Ischemia-modified albumin is a highly sensitive serum marker of transient myocardial ischemia induced by coronary vasospasm. *Coron Artery Dis* 2007;18:83-87.
11. Sbarouni E, Georgiadou P, Theodorakis GN, Kremastinos DT. Ischemia-modified albumin in relation to exercise stress testing. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:2482-2484.

12. Fagan GJ, Wayment H, Morris DL, Crosby PA. The albumin cobalt binding test: analytical performance of a new automated chemistry assay for the detection of ischemia modified albumin (IMA). *Journal of Clinical Ligand Assay* 2002;25:178-187.
13. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311-315.
14. Sinha MK, Roy D, Gaze DC, Collinson PO, Kaski JC. Role of "ischemia modified albumin", a new biochemical marker of myocardial ischaemia, in the early diagnosis of acute coronary syndromes. *Emerg Med J* 2004;21:29-34.
15. Bhagavan NV, Lai EM, Rios PA, et al. Evaluation of human serum albumin cobalt binding assay for the assessment of myocardial ischemia and myocardial infarction. *Clin Chem* 2003;49:581-585.
16. Ceyhan M, Ozalp I, Altay C. High levels of lactate, pyruvate, and alanine in anemic children. *Clin Pediatr* 1988;27:206-209.
17. Gidenne S, Ceppa F, Fontan E, Perrier F, Burnat P. Analytical performance of the albumin cobalt binding (ACB[®]) test on the Cobas MIRA[®] Plus analyzer. *Clin Chem Lab Med* 2004;42:455-461.
18. Sharma R, Gaze DC, Pellerin D, et al. Ischemia-modified albumin predicts mortality in ESRD. *Am J Kidney Dis* 2006;47:493-502.
19. Christenson RH, Duh SH, Sanhai WR, et al. Characteristics of an albumin cobalt binding test for assessment of acute coronary syndrome patients: a multicenter study. *Clin Chem* 2001;47:464-470.
20. Berenshtein E, Mayer B, Goldberg C, Kitrossky N, Chevion M. Patterns of mobilization of copper and iron following myocardial ischemia: possible predictive criteria for tissue injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:3025-3034.
21. Mothes E, Faller P. Evidence that the principal Co^{II}-binding site in human serum albumin is not at the N-terminus: implication on the albumin cobalt binding test for detecting myocardial ischemia. *Biochemistry* 2007;46:2267-2274.

22. Valentini J, Schmitt GC, Grotto D, et al. Human erythrocyte delta-aminolevulinatase dehydratase activity and oxidative stress in hemodialysis patients. *Clin Biochem* 2007;40:591-594.
23. Roy D, Kaski JC. Ischemia-modified albumin: the importance of oxidative stress. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2375-6.
24. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 2006;92:113-4.
25. Chan B, Dodsworth N, Woodrow J, Tucker A, Harris R. Site-specific N-terminal auto-degradation of human serum albumin. *Eur J Biochem* 1995;227:524-8.
26. Lippi G, Montagnana M, Salvagno GL, Guidi GC. Standardization of ischemia-modified albumin testing: adjustment for serum albumin. *Clin Chem Lab Med* 2007;45:261-262.
27. Lee YW, Kim HJ, Cho YH, Shin HB, Choi TY, Lee YK. Application of albumin-adjusted ischemia modified albumin index as an early screening marker for acute coronary syndrome. *Clin Chim Acta* 2007;384:24-27.
28. Roach RC, Koskolou MD, Calbet JA, Saltin B. Arterial O₂ content and tension in regulation of cardiac output and leg blood flow during exercise in humans. *Am J Physiol* 1999;276:H438-445.
29. Saltin B, Kiens B, Savard G, Pedersen PK. Role of haemoglobin and capillarization for oxygen delivery and extraction in muscular exercise. *Acta Physiol Scand* 1986;128:21-32.
30. Haaland K, Kofstad J, Apricena F, Thoresen M. Haemoglobin is inversely related to plasma lactate and heart rate in the newborn piglet. *Biol Neonate* 1996;69:350-356.
31. Gregg SG, Mazzeo RS, Budinger TF, Brooks GA. Acute anemia increases lactate production and decreases clearance during exercise. *J Appl Physiol* 1989;67:756-764.
32. Ohira Y, Chen CS, Hegenauer J, Saltman P. Adaptations of lactate metabolism in iron-deficient rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;173:213-216.

33. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Polychronidis A, et al. Endogenous markers of hypoxia/anaerobic metabolism and anemia in primary colorectal cancer. *Cancer Sci* 2006;97:582-588.

Table 1. Characteristics of study participants

	Control	Anemia
Hematocrit (%)	42.68 ± 1.27	30.19 ± 1.24 ^c
Hemoglobin (g/dL)	14.43 ± 0.54	9.77 ± 0.40 ^c
Iron (µg/mL)	71.95 ± 3.95	53.82 ± 3.90 ^a
Ferritin (ng/mL)	83.79 ± 6.92	213.60 ± 38.13 ^b
Albumin (g/dL)	4.00 ± 0.06	3.17 ± 0.04 ^c
Creatinine (mg/dL)	0.86 ± 0.04	5.52 ± 0.37 ^c
Lactate (mmol/L)	1.07 ± 0.05	2.75 ± 0.29 ^c

Values are given as mean ± SEM.

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ and ^c $P < 0.001$

Figure 1

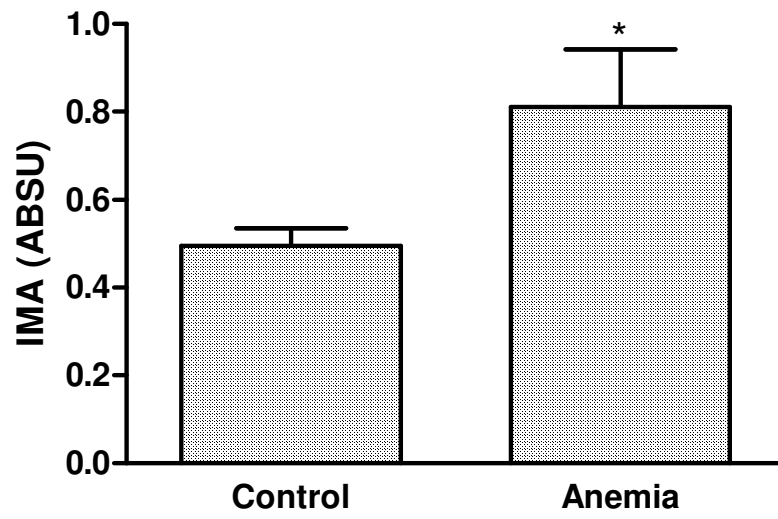


Figure 2

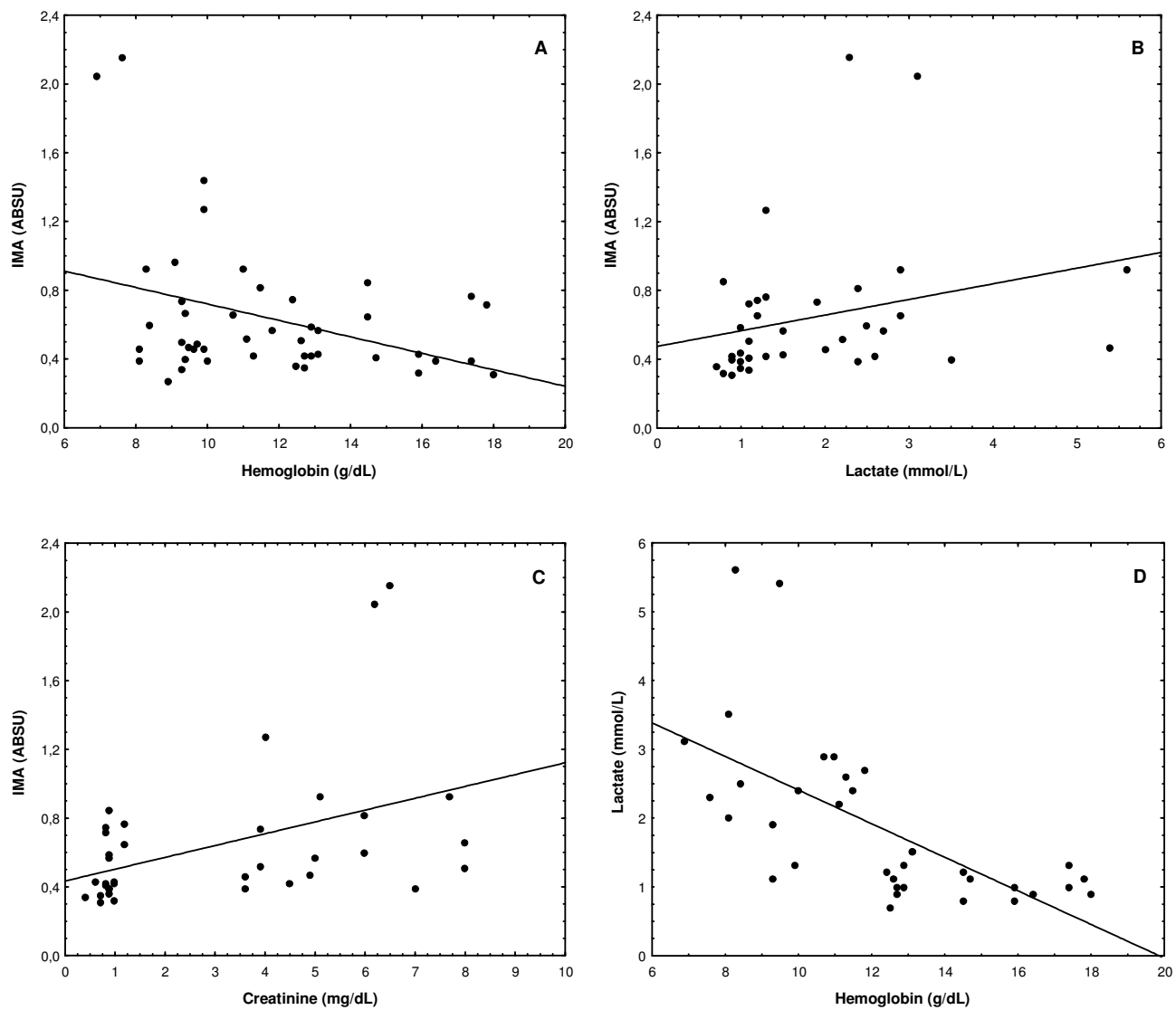


Figure 1. IMA values observed in the study participants. * $P < 0.05$

Figure 2. Significant correlations between (A) IMA and hemoglobin ($r = -0.3442$, $P = 0.0398$), (B) IMA and lactate ($r = 0.4616$, $P = 0.0046$), (C) IMA and creatinine ($r = 0.5008$, $P = 0.0019$), and (D) lactate and hemoglobin ($r = -0.7195$, $P < 0.0001$).