

BIOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA EM CARDIOPATIAS

Laíse Oliveira Resende 1*, Renata Pereira Alves Balvedi 2*, João Marcos Madurro 3*, Ana Graci Brito Madurro 4*, Adriano O. Andrade 5*

*Universidade Federal de Uberlândia, Brasil
e-mail: laiseresende@yahoo.com.br

Resumo: O infarto consiste em uma obstrução da artéria coronária e na consequente interrupção do suprimento sanguíneo para determinada região miocárdica. O rápido diagnóstico da síndrome coronariana isquêmica é importante para que a terapêutica adequada seja escolhida precocemente, sendo possível assim, a obtenção de melhor prognóstico. O diagnóstico do infarto do miocárdio é realizado a partir do exame clínico, avaliação de alterações eletrocardiográficas e elevação dos biomarcadores. Devido à alta incidência de doenças cardiovasculares, observa-se a importância da rápida detecção e quantificação de marcadores bioquímicos de lesão miocárdica para a obtenção de um diagnóstico preciso. Destaca-se a necessidade do desenvolvimento e avaliação clínica de biossensores para monitoramento desses biomarcadores em fluidos corporais. Nesta pesquisa é apresentado um biossensor desenvolvido para detecção de proteína C reativa (PCR), que é uma proteína de fase aguda, liberada em processos inflamatórios. Concentrações crescentes de PCR possuem associação com risco de eventos cardiovasculares. Utilizou-se a ressonância de plasma de superfície para detecção da proteína C reativa. O sensor foi avaliado a partir de testes realizados com soro de pacientes acometidos por infarto do miocárdio, os quais obtiveram valores positivos para proteína C reativa e pacientes do grupo controle, com resultado negativo para proteína C reativa. Os resultados obtidos demonstraram que o biossensor desenvolvido para detecção de PCR demonstrou eficácia e potencial utilização para o diagnóstico de cardiopatias.

Palavras-chave: biossensor, infarto do miocárdio, proteína C reativa, ressonância de plasma de superfície.

Abstract: Myocardial infarction consists of a coronary artery obstruction and the consequent interruption of blood supply to a myocardial region. Rapid diagnosis of ischemic coronary syndrome is important to the definition of the appropriate therapy, so that it is possible to obtain a better prognosis. The diagnosis of myocardial infarction is performed from the clinical examination, assessment of electrocardiographic changes and elevated biomarkers. Due to the high incidence of cardiovascular disease, it was observed the importance of early detection and quantification of biochemical markers of myocardial injury in order to obtain an accurate diagnosis. It was highlighted the need of the development and clinical evaluation of

biosensors for monitoring these biomarkers in body fluids. This research presents the development of a biosensor for the detection of C reactive protein (CRP), which is an acute phase protein, released in inflammatory processes. Increasing concentrations of CRP have association with risk of cardiovascular events. We used the surface plasmon resonance for the detection of C reactive protein. The sensor was evaluated from tests performed with sera from patients suffering from myocardial infarction, which showed positive values for C reactive protein and control patients with negative results for C reactive protein. The results demonstrated that the biosensor developed to detect CRP demonstrated efficacy and potential use in the diagnosis of heart diseases.

Keywords: biosensor, myocardial infarction, C reactive protein, surface plasmon resonance.

Introdução

O infarto do miocárdio está associado à interrupção do fluxo sanguíneo para uma determinada área, devido à obstrução completa ou parcial da artéria coronária responsável por sua irrigação. A extensão da necrose depende de vários fatores, tais como o calibre da artéria acometida e tempo de evolução da obstrução [1].

Marcadores bioquímicos cardíacos são componentes das estruturas celulares liberadas na circulação quando ocorre lesão do miocárdio. Os testes para quantificação dessas macromoléculas no soro sanguíneo são relevantes devido à obtenção de informações associadas à severidade e estágio da lesão cardíaca [2, 3].

As doenças cardiovasculares aparecem em primeiro lugar entre as causas de morte no Brasil, aproximadamente 300 mil óbitos anuais, representando quase um terço dos óbitos totais e 65% do total de mortes na faixa etária de 30 a 69 anos de idade, atingindo a população adulta em plena fase produtiva. Em 2007 foram registradas 1.157.509 internações por doenças do aparelho circulatório, gerando alto custo para os cofres públicos [4].

Segundo a Organização Mundial de Saúde, aproximadamente 17 milhões de pessoas, mundialmente, morrem de doenças cardiovasculares. Estima-se que até 2015, 20 milhões de pessoas morram devido a doenças cardiovasculares (principalmente

infarto agudo do miocárdio e acidente vascular encefálico).

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda, liberada em processos inflamatórios. Estudos epidemiológicos demonstraram associação entre o risco de eventos cardiovasculares e concentrações crescentes da PCR [5 - 7].

A PCR está sendo considerada como marcador padrão-ouro para inflamação e para doenças cardiovasculares. Evidências indicam que a aterosclerose é uma doença inflamatória imune-mediada [8].

A associação da PCR às síndromes coronarianas consiste em sua função no desenvolvimento de processos inflamatórios na aterosclerose, como: indução da expressão de moléculas de adesão, redução da produção de óxido nítrico pelas células endoteliais [9] e aumento da captura de lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelos macrófagos [7], fatores que contribuem para o desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica.

Observa-se a possibilidade de estratificação de categorias de risco cardiovascular, de acordo com a concentração detectada de PCR (Figura 1). Concentrações abaixo de 1 mg/L são associadas a baixo risco, entre 1 e 3 mg/L são indicativas de risco moderado e acima de 3 mg/L demonstram alto risco. Valores acima de 10 mg/L são considerados sugestivos de alterações e possível resposta de fase aguda [7, 10].



Figura 1: Interpretação clínica da proteína C reativa para predição de risco cardiovascular.

Para detecção da proteína C reativa, podem-se utilizar transdutores ópticos, os quais funcionam por meio de medidas de absorção ou emissão de luz a partir de uma reação bioquímica. Neste tipo de biossensor, ondas de luz são guiadas por meio de fibras ópticas para um detector adequado [11]. Um exemplo é a ressonância de plasma de superfície (SPR).

Devido à alta incidência de doenças cardiovasculares, destaca-se a necessidade do desenvolvimento e avaliação clínica de biossensores para monitoramento de biomarcadores em fluidos corporais, de maneira rápida, eficaz, sensível e específica para a obtenção de um diagnóstico preciso.

O objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de um biossensor para detecção de proteína C reativa, devido à associação desta com doenças cardiovasculares e à importância da quantificação dessa proteína para auxílio diagnóstico e utilização durante a evolução clínica do paciente. Sendo assim, esta pesquisa apresenta os testes realizados com soros de pacientes positivos e negativos para proteína C reativa, utilizando SPR, com a finalidade de desenvolver um biossensor a

partir da interação antígeno-anticorpo para detecção e discriminação desta molécula.

Materiais e métodos

O imunossensor foi desenvolvido sobre a superfície do eletrodo de ouro (Figura 2) e avaliado por ressonância de plasma de superfície (Figura 3).

O princípio de desenvolvimento do sensor a partir da SPR envolve um feixe luminoso que atravessa um prisma e alcança uma superfície de ouro, de forma a excitar os plásmons de superfície. As alterações nas proximidades da interface metal/ambiente proporcionam uma alteração nas condições de ressonância do sistema, sendo assim, ocorre um deslocamento no ângulo. As propriedades ópticas do sistema, como as constantes dielétricas do metal, do prisma e da matriz, provocam mudanças no ângulo de ressonância, o que possibilita o monitoramento de alterações na superfície do sensor, a partir do acompanhamento do ângulo de ressonância em função do tempo. Sendo assim, o monitoramento do índice de refração nas proximidades da superfície do sensor torna possível a aplicação da técnica de SPR para obter informações em tempo real [12, 13]. Além disso, é possível monitorar a refletividade em função da variação do comprimento de onda [14].



Figura 2: Eletrodo de ouro no prisma.



Figura 3: Ressonância de plasma de superfície.

As coletas de soro sanguíneo dos pacientes foram realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A quantificação da proteína C reativa foi realizada por teste imunoturbidimétrico, com concentração de $224 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para o paciente positivo, acometido por infarto do miocárdio, com alteração de PCR e concentração de $5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ para o paciente negativo, sem alterações relacionadas à síndrome coronariana isquêmica.

Foram utilizados 100 microlitros de anticorpo (anti-PCR) e 100 microlitros de antígeno (soro de pacientes acometidos por infarto do miocárdio). Utilizou-se solução de caseína para bloquear a superfície de ouro e as lavagens foram realizadas com tampão fosfato entre as fases de imobilização, bloqueio da superfície e adição de soro. Foram realizados testes com soros positivo e negativo para PCR.

Resultados

O resultado obtido nos testes de SPR apresentados na Figura 4 demonstra que houve discriminação angular entre os soros positivo e negativo. O valores angulares do paciente positivo foi de $657,42 \text{ m}^\circ$ e do paciente negativo foi de $130,16 \text{ m}^\circ$.

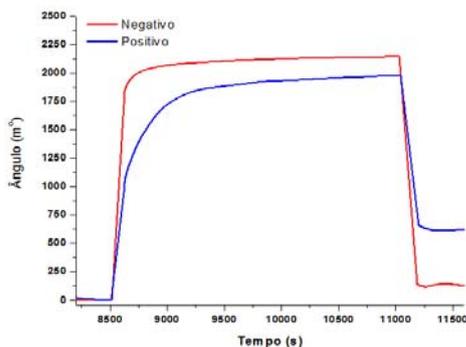


Figura 4: Discriminação dos soros positivo e negativo para proteína C reativa.

Para validar o sistema, testes em triplicatas foram realizados para cada tipo de soro positivo e negativo, conforme demonstrado na Figura 5.

As médias e desvios padrões dos valores angulares dos soros testados de pacientes foram: $690,59 \pm 82,92 \text{ m}^\circ$ para o paciente positivo e $111,55 \pm 58,06 \text{ m}^\circ$ para o paciente negativo.

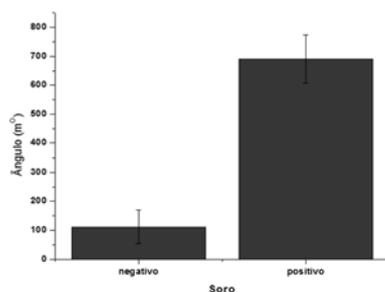


Figura 5. Média e desvio padrão da triplicata realizada para pacientes positivo e negativo para proteína C reativa.

Discussão

O desenvolvimento de biossensores para a quantificação da proteína C reativa é relevante para a prática clínica e para associação desta enzima com processos inflamatórios, principalmente relacionados a síndromes coronarianas isquêmicas. A ressonância de plasma de superfície é um método óptico que quantifica a mudança do índice de refração devido à interação antígeno-anticorpo.

Os imunossensores fundamentam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com um antígeno. A imobilização do receptor (anticorpo) sobre um substrato transdutor é realizada para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (antígeno) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de sensores para diagnósticos clínicos.

Os fatores que tornam a proteína C reativa um bom marcador são: a resistência à quebra entre a coleta da amostra e a realização do exame laboratorial, a presença no sangue somente quando está sendo produzida no fígado por estímulo e as análises altamente sensíveis de PCR, que podem medir níveis dentro da faixa normal (0,0 a 0,5 mg/dL). Tem sido sugerido que um nível de PCR até 1mg/dL indica uma inflamação de baixo grau e acima deste valor poderá ser utilizado como um marcador para prognóstico de eventos cardiovasculares [7]. Foi utilizado o soro humano de pacientes com valores baixos de PCR para que este soro oferecesse um algum padrão do índice de refração do soro sem PCR. Desta forma foi possível iniciar o estudo de sensibilidade deste imunossensor quando o soro de paciente positivo foi testado no SPR com concentrações elevadas de PCR.

A discriminação angular entre os soros demonstra que o sistema foi eficaz na seletividade para PCR dentre os outros componentes do soro.

O teste em SPR tem a capacidade de ser realizado em menor tempo quando comparado às técnicas atuais utilizadas. Além disso, o dispositivo possibilita a utilização de pequena quantidade de amostra e a realização de medições contínuas, sendo portanto, um dispositivo inovador e promissor para avaliação de cardiopatias.

Conclusão

Tendo em vista a importância de diagnóstico precoce da síndrome coronariana isquêmica, observa-se a importância do desenvolvimento e validação de biossensores para detecção de marcadores de lesão miocárdica, além da importância da detecção de proteínas de fase aguda, liberada em processos inflamatórios e associadas a eventos cardiovasculares, de acordo com o crescente aumento de suas concentrações.

O biossensor desenvolvido para detecção de proteína C reativa com utilização da ressonância de

plasma de superfície demonstrou eficácia e potencial utilização como auxílio diagnóstico de cardiopatias.

O desenvolvimento e aplicações clínicas de biossensores propiciam avanço científico e tecnológico na área de cardiologia, com destaque para as possibilidades de inserção de novos dispositivos na prática clínica e considerável melhoria no diagnóstico de pacientes acometidos por infarto do miocárdio.

Portanto, a implementação de biossensores como auxílio diagnóstico da síndrome coronariana isquêmica possibilita a realização de diagnósticos mais rápidos, decisão precoce do tratamento necessário e possível encaminhamento para revascularização miocárdica, acompanhamento da evolução clínica a partir de biomarcadores e melhor prognóstico dos pacientes.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo suporte financeiro a este trabalho.

Referências

- [1] Braunwald E, Zipes DP, Libby P. Tratado de Medicina Cardiovascular. 6ª ed., v. 1. São Paulo: Roca, 2003.
- [2] Brieger D, Eagle KA, Goodman SG, Steg PG, Budaj A, White K, Montalescot G. Acute coronary syndromes without chest pain, an underdiagnosed and undertreated high-risk group: insights from the global registry of acute coronary events. *Chest*, v. 126 (2), p. 461-469, 2004.
- [3] Anderson JL. Infarto agudo do miocárdio com elevação do segmento ST e complicações do infarto do miocárdio. In: Goldman, L.; Ausiello, D. Tratado de Medicina Interna. 22ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 472-489, 2005.
- [4] Bezerra DS, Silva AS, Carvalho ALM. Avaliação das características dos usuários com hipertensão arterial e/ou diabetes mellitus em uma Unidade de Saúde Pública, no município de Jaboatão dos Guararapes-PE, Brasil. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 30 (1), p. 56-60, 2009.
- [5] Gilstrap LG, Wang TJ. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. *Clinical chemistry*, v. 58, n. 1, p. 72-82, 2012.
- [6] Ge Y, Wang TJ. Identifying novel biomarkers for cardiovascular disease risk prediction. *Journal of internal medicine*, v. 272, n. 5, p. 430-439, 2012.
- [7] Montgomery JE, Brown JR. Metabolic biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Vascular health and risk management*, v. 9, p. 37-45, 2013.
- [8] Nyström T. C-reactive protein: a marker or a player? *Clinical Science*, v. 113, p. 79-81, 2007.
- [9] Ramasamy, I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, v. 412, n. 15-16, p. 1279-96, 2011.
- [10] Ridker PM. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. *Circulation*, v. 108 (12), p. 81-85, 2003.
- [11] Danielsson B. Calorimetric biosensors. *Journal of Biotechnology*, v. 15, n. 3, p. 187-200, 1990.
- [12] Zhang JXJ, Hoshino K. Optical Transducers: Optical Molecular Sensors and Optical Spectroscopy. *Molecular Sensors and Nanodevices. Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering*, Chapter 5, p. 233-320, 2014.
- [13] Green RJ, Frazier RA, Shakesheff KM, Davies MC, Roberts CJ, Tendler SJB. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, p. 1823-1835, 2000.
- [14] Hanken DG, Jordan CE, Frey BL, Corn RM. Surface Plasmon Resonance measurements of ultrathin organic films at electrode surfaces. *Electroanalytical Chemistry*, v. 20, p. 141-225, 1998.