

Avaliação dos Níveis Séricos de Marcadores de Inflamação, Fibrinólise e Estresse Oxidativo na Predição de Doença Arterial Coronariana: Estudo Transversal

Evaluation of Serum Levels of Inflammation, Fibrinolysis and Oxidative Stress Markers in Coronary Artery Disease Prediction: A Cross-Sectional Study

Sakhavat Abolhasani,^{1,2} Shahnam Valizadeh Shahbazloo,² Hossein Mozafar Saadati,³ Neda Mahmoodi,² Nafiseh Khanbabaei¹

Department of Clinical Biochemistry - Student Research Committee - School of Medicine - Shahid Beheshti University of Medical Sciences,¹ Tehran, Irã

Department of Clinical Biochemistry - Faculty of Medicine - Tabriz University of Medical Sciences,² Tabriz, Irã

Department of Epidemiology - School of Public Health and safety - Shahid Beheshti University of Medical Sciences,³ Tehran, Irã

Resumo

Fundamento: A doença arterial coronariana (DAC) tem sido há muito reconhecida como um problema de saúde global. Inflamação, fibrinólise e estresse oxidativo desempenham um papel importante no acometimento das placas, levando à DAC. Os marcadores que refletem esse mecanismo fisiopatológico podem ter valor prognóstico.

Objetivo: Estimar as concentrações séricas com valor prognóstico significativo da proteína C-reativa de alta sensibilidade (PCR-as), ácido siálico (AS), vitronectina (VN), inibidor do ativador do plasminogênio-1 (PAI-1), lipoproteína de baixa densidade oxidativa (OX-LDL) e malondialdeído (MDA) em pacientes com DAC.

Métodos: Os marcadores incluídos, PCR-as, AS, VN, PAI-1, OX-LDL e MDA, foram comparados entre 160 pacientes com DAC com diagnóstico angiográfico e 20 indivíduos saudáveis pareados por idade e sexo. Os sujeitos foram divididos em 4 grupos de acordo com os resultados da angiografia, e a associação entre todos os fatores de risco da DAC foi estudada. Os níveis séricos de AS, VN, PAI-1 e OX-LDL foram medidos por ensaio imunoenzimático (ELISA); MDA foi medido com base na reação com ácido tiobarbitúrico (TBA); e o nível de PCR-as foi estimado por imunoturbidimetria utilizando um kit comercial. O valor diagnóstico dessas variáveis foi avaliado posteriormente pela análise da curva ROC. Regressão logística múltipla foi utilizada para avaliar o poder diagnóstico da combinação. Além disso, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Resultados: Os níveis séricos de PCR-as, AS, VN, PAI-1 e OX-LDL foram significativamente maiores nos grupos de pacientes em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$). Usando ambos os pacientes normais e com DAC como sujeitos, a análise ROC foi realizada. O ponto de corte para OX-LDL, MDA, PAI-1, VN, PCR-as e AS foi de 2,67 (ug/mL), 5,49 (mmol/mL), 67 (ng/mL), 254 (ng/mL), 3,4 (mg/dL) e 7/89 (mg/dL), respectivamente. Finalmente, a eficácia diagnóstica completa foi classificada em: AS, PCR-as, PAI-1, OX-LDL, MDA e VN.

Conclusão: Os níveis séricos de AS, PCR-as, VN, PAI-1, OX-LDL e MDA podem ser preditivos de desfechos cardiovasculares adversos. Curiosamente, essas análises podem ajudar como marcadores de diagnóstico e monitoramento em pacientes com DAC. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(4):667-674)

Palavras-chave: Doença Arterial Coronariana; Biomarcadores; Inflamação; Fibrinólise; Estresse Oxidativo; Ácidos Siálicos; Vitronectina.

Abstract

Background: Coronary Artery Disease (CAD) has long been recognized as a global health issue. Inflammation, Fibrinolysis and Oxidative Stress play an important role in the disruption of plaques leading to CAD. Markers that reflect this pathophysiologic mechanism may have prognostic value.

Objective: To estimate the serum concentrations of high-sensitivity C-reactive protein (hs-CRP), sialic acid (SA), vitronectin (VN), plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1), oxidized low density lipoprotein (OX-LDL) and malondialdehyde (MDA) with significant prognostic value in patients with CAD.

Methods: The markers included, hs-CRP, SA, VN, PAI-1, OX-LDL and MDA, were compared between 160 angiographically diagnosed CAD patients and 20 age- and sex-matched healthy individuals. The subjects were divided into 4 groups according to angiography results, and association between all risk factors of CAD was studied. Serum levels of SA, VN, PAI-1, and OX-LDL were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); MDA was measured based on reaction with thiobarbituric acid (TBA); and hs-CRP level was estimated by immunoturbidimetry using a commercial kit. The diagnostic value of these variables was further assessed by ROC curve analysis. Multiple logistic regression was used to evaluate the diagnostic power of the combination. Furthermore, $p < 0.05$ was considered as significant.

Results: Serum levels of hs-CRP, SA, VN, PAI-1, and OX-LDL were significantly higher in patient groups compared to control group ($p < 0.001$). Using both normal and CAD patients as subjects, ROC analysis was performed. The cutoff for OX-LDL, MDA, PAI-1, VN, hs-CRP and SA was 2.67 (ug/mL), 5.49 (mmol/mL), 67 (ng/mL), 254 (ng/mL), 3.4 (mg/dL), 7/89 (mg/dL), respectively. Eventually, the complete diagnostic efficacy was classified as: SA, hs-CRP, PAI-1, OX-LDL, MDA and VN.

Conclusion: Serum levels SA, hs-CRP, VN, PAI-1, OX-LDL and MDA may be predictive of adverse cardiovascular outcomes. Interestingly, these analyses can help as diagnostic and monitoring markers in CAD patients. (Arq Bras Cardiol. 2019; 113(4):667-674)

Keywords: Coronary Artery Disease; Biomarkers; Inflammation; Fibrinolysis; Oxidative Stress; Sialic Acids; Vitronectin.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Sakhavat Abolhasani •

Department of Clinical Biochemistry, School of Medicine - Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Yemen Street, Chamran Highway, Tehran - Irã
E-mail: bio.sakhi@gmail.com

Artigo recebido em 26/10/2018, revisado em 26/12/2018, aceito em 30/01/2019

Introdução

A doença arterial coronariana aterosclerótica (DAC) continua sendo um dos principais problemas de saúde do mundo, responsável por 12,7% da mortalidade global.¹ Conforme sabemos, a aterosclerose é conhecida como um processo inflamatório crônico que se inicia com a disfunção ou ativação do endotélio arterial. Além disso, o dano endotelial e as espécies reativas de oxigênio (e outros radicais livres) surgem como fatores principais em praticamente todas as vias que levam ao desenvolvimento da aterosclerose.² Fatores de risco identificados recentemente relacionados à doença cardiovascular pró-aterogênica incluem aqueles associados a coagulação ou fibrinólise prejudicadas, remodelamento cardiovascular e inflamação.³ Notavelmente, o aumento nos níveis plasmáticos de marcadores de risco para doença cardiovascular aterosclerótica tem sido reconhecido por desempenhar um papel importante tanto no início como na progressão da placa aterosclerótica. Esses marcadores prognósticos podem auxiliar na terapia para corresponder à intensidade da doença do paciente.⁴⁻⁸

Notavelmente, a Vitronectina (VN) está presente no plasma, na matriz extracelular e nos grânulos de plaquetas sanguíneas. Ela consiste de glicoproteínas adesivas, que desempenham um papel fundamental na regulação de processos como adesão plaquetária, agregação e coagulação, via ligação à integrina, ao inibidor do ativador do plasminogênio (PAI-1), ao receptor do ativador do plasminogênio uroquinase (UPAR), e à heparina.^{9,10} Apesar disso, os níveis plasmáticos de VN mostraram-se significativamente aumentados em pacientes com DAC, mostrando também uma correlação positiva com a gravidade da doença.¹¹ Notavelmente, o PAI-1 foi reconhecido como uma molécula central ligada à patogênese e a progressão de eventos vasculares trombóticos, incluindo acidente vascular cerebral. Além disso, níveis elevados de PAI-1 no plasma estão associados à trombose vascular.¹² Um estudo anterior sugeriu que altos níveis de PAI-1 na DAC estão associados ao risco de disfunção endotelial e de aterosclerose prematura.¹³ O ácido siálico (AS) é derivado do ácido neuramínico e compreende a porção terminal de açúcar da cadeia de oligossacarídeos em glicolipídeos e glicoproteínas, atuando como cofator em vários receptores da superfície celular, como o receptor de LDL. Sua ingestão de LDL se dá predominantemente nas células musculares lisas dos vasos sanguíneos, e está aumentada em vários estados patológicos e inflamatórios, como na aterosclerose.^{5,14,15} Portanto, após uma reação inflamatória ou lesão, a descamação ou secreção de células danificadas pode levar a uma concentração elevada de AS.¹⁶ O estresse oxidativo e a inflamação também desempenham papéis vitais na patogênese e progressão da DAC.⁶ Lipoproteína de baixa densidade oxidada (OX-LDL) e compostos correlacionados também são observados na formação de lesões nos estágios mais tardios da aterosclerose. Assim, a OX-LDL poderia desempenhar um papel importante tanto nas complicações da aterogênese quanto nas da placa.^{17,18} Além disso, o malonaldeído (MDA) resulta da peroxidação lipídica, e sua medição é um marcador indiscutível de dano oxidativo, fazendo do MDA um indicador e marcador adequado para identificação e posterior avaliação de pacientes com DAC.¹⁷ Entre vários marcadores de inflamação, a proteína C-reativa altamente sensível (PCR-as) foi estabelecida

como significativa em pessoas com DAC. Vários estudos demonstraram que a PCR-as está associada ao aumento do risco de DAC.¹⁹ Achados anteriores reportaram níveis elevados de VN, MDA, OX-LDL, PAI-1, PCR-as e AS que estavam positivamente correlacionados com DAC. Embora os aspectos patológicos desses fatores de risco tenham sido estudados, seu papel não foi reconhecido no diagnóstico precoce e preciso da aterosclerose em pacientes com DAC. Este estudo teve como objetivo determinar as concentrações com valor prognóstico dos níveis séricos de PCR-as, AS, VN, PAI-1, OX-LDL e MDA em pacientes com DAC, todos os quais podem se manifestar na DAC, com o intuito de examinar a importância de combinar esses biomarcadores com o diagnóstico de DAC.

Métodos

Sujeitos

O tamanho da amostra foi de 180 sujeitos, com base em uma amostra de conveniência. Os sujeitos foram divididos em 4 grupos de acordo com os resultados da angiografia. O grupo controle foi um grupo sem estenose que incluiu 40 indivíduos com doença não significativa que não tinham vasos ocluídos, mas sofriam de dor torácica como angina pectoris; 40 com doença de um vaso entupido (1VD), 40 com doença de dois vasos ocluídos (2VD) e 40 indivíduos com doença de três vasos ocluídos (3VD). Além disso, o grupo controle foi composto por indivíduos saudáveis sem qualquer apresentação de DAC (n = 20). A coleta de sangue periférico foi obtida após uma noite de jejum no hospital Shahid Madani, localizado no leste do Azerbaijão, no Irã.

Ética

Antes do início do estudo, o protocolo foi apresentado ao comitê de ética independente da Medical Faculty of the Tabriz University of Medical Sciences (número de ética 91/2-3/5). Foi obtido um consentimento informado de todos os participantes. Todos os pacientes com doença renal, distúrbios pulmonares, disfunção hepática, doença autoimune, doenças infecciosas e câncer foram excluídos do estudo.

Métodos laboratoriais

Todas as amostras de sangue foram obtidas de uma veia periférica após 12 horas de jejum durante a noite. O plasma e o soro subsequentes foram separados em 30 minutos, e as amostras foram armazenadas a -70°C até os testes serem realizados.

Medição dos parâmetros

Procedimentos de ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) foram utilizados para determinar os níveis séricos de OX-LDL (Glory Science Co. Ltd, N° de Cat. 93614), os níveis de PAI-1 (Boster Science co. Ltd, N° de Cat. EK0859) e os Níveis de VN. (Glory Science co. Ltd, N° de Cat. 11668). O AS também foi medido por ELISA, usando um kit comercial (Crystal Day, China). O MDA sérico foi medido com base na reação com Ácido Tiobarbitúrico (TBA); a extração foi acompanhada de butanol normal; a absorção foi medida por espectrofotômetro e o valor foi calculado de acordo com uma curva padrão. Os níveis séricos de PCR-as foram estimados

pelo método de turbidimetria de alta sensibilidade usando o kit Biosystems (Barcelona, Espanha, COD 31927); o ensaio foi avaliado em um semi-autoanalisador (Alcyon 300, feito nos EUA) no laboratório de Bioquímica.

Métodos analíticos

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS, versão 20.0 (SPSS Inc., Illinois, EUA). Todas as variáveis quantitativas foram expressas como média \pm desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. As variáveis qualitativas foram expressas em números e porcentagem. A normalidade dos dados foi avaliada pela curva normal (assimetria e desvio padrão da assimetria) do teste de Kolmogorov-Smirnov. Diferenças para grupos múltiplos foram analisadas usando teste t independente e a análise de variância unidirecional (ANOVA). Além disso, o teste do qui-quadrado foi utilizado para variáveis categóricas. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para as variáveis quantitativas se a hipótese de normalidade dos resíduos não fosse atingida. Além disso, a análise da curva ROC foi utilizada para avaliar o efeito diagnóstico de VN, MDA, LDL-OX, PAI-1, PCR-as e AS pelo modelo de regressão logística. Uma análise estatística foi definida quando $p < 0,05$.

Resultados

Os indicadores prognósticos foram utilizados no presente estudo. A Tabela 1 lista as características gerais dos grupos de estudo. As diferenças entre o grupo de pacientes e o controle com base na distribuição por idade e sexo foram submetidas a um teste t de amostras independentes. Os resultados mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,3$). No entanto, tabagismo, hipertensão e diabetes mostraram diferença significativa entre o grupo de pacientes e o controle (valor de p : 0,004, 0,01 e 0,02, respectivamente). A Tabela 2 apresenta os valores médios dos parâmetros dos grupos, obtidos a partir de uma análise ANOVA unidirecional; os níveis séricos médios dos parâmetros que foram comparados entre os subgrupos foram categorizados com base no número de vasos ocluídos da população do estudo. Diferenças significativas em todos os fatores de risco cardiovascular medidos foram encontrados em todos os subgrupos em comparação com os controles ($p < 0,001$ para todos eles). Além disso, houve diferenças significativas entre os subgrupos que não foram mencionadas (previamente relatadas em outras referências).^{11,20,21} Os valores críticos dos níveis de VN, MDA, OX-LDL, PAI-1, PCR-as e AS foram determinados pela análise da curva ROC. Tanto a especificidade quanto a sensibilidade desses seis parâmetros em relação à DAC foram comparadas. Um ensaio combinado foi então realizado, usando seis índices. Além disso, usando tanto indivíduos saudáveis quanto pacientes com DAC como sujeitos, foi realizada análise ROC, que mostrou as áreas sob a curva de LDL-OX, MDA, PAI-1, VN, PCR-as e AS (0,870, 0,804, 0,951, 0,799, 0,962 e 0,971, respectivamente). Todos os fatores de risco tiveram eficácia diagnóstica satisfatória para DAC. A classificação geral de eficácia foi (de inferior para superior): VN, MDA, OX-LDL, PAI-1, AS e PCR-as. O PAI-1, AS e PCR-as apresentaram validade particularmente alta no diagnóstico da DAC (Figura 1 e Tabela 3). Notavelmente, os critérios

das variáveis foram especificados com referência aos níveis de ocorrência em pessoas normais e pacientes com DAC. O ponto de corte para OX-LDL, MDA, PAI-1, VN, PCR-as e AS foi 2,67 (ug/mL), 5,49 (mmol/mL), 67 (ng/mL), 254 (ng/mL), 3,4 (mg/dL), 7/89 (mg/dL), respectivamente. A sensibilidade e especificidade foram de 70% e 75%, 74% e 77%, 92% e 90%, 70% e 83%, 94% e 93%, 94% e 96%, respectivamente. PAI-1, AS e PCR-as tiveram a maior sensibilidade e especificidade do teste em comparação com o OX-LDL, MDA e VN (Tabela 4). A eficácia do ensaio combinado foi em seguida comparada utilizando seis parâmetros (OX-LDL, MDA, VN, PAI-1, AS e PCR-as). Esse ensaio combinado aumentou o valor preditivo da sensibilidade e da especificidade para 99% e 99%, respectivamente (Tabela 5). A área sob curva ROC foi de 0,99 (IC95%: 0,975~1,005, Figura 2).

Discussão

Comumente, os principais fatores de risco que causam lesões ateroscleróticas nas artérias coronárias humanas compreendem fatores genéticos, hiperlipidemia, diabetes, infecções, hipertensão ou estresse oxidativo, com pouca correlação com a idade dos pacientes e fatores ambientais.²² É importante ressaltar que este processo patológico inclui macrófagos e células de músculo liso, com adição e deposição de lipídios e proteínas da matriz extracelular, especialmente a glicoproteína.^{22,23} Estudos anteriores confirmaram que os níveis séricos de VN, PAI-1, OX-LDL, MDA, PCR-as e AS são significativamente mais elevados em pacientes com DAC em comparação com controles saudáveis, e demonstram correlação positiva com doenças severas. O aumento dessas análises em pacientes com DAC quando comparados aos controles já está bem destacado em estudos recentes.^{11,20,21,24} O presente estudo avaliou consideravelmente o valor prognóstico de biomarcadores de glicoproteína, fibrinólise, estresse oxidativo e inflamatórios, incluindo VN, PAI-1 e OX-LDL, MDA, PCR-as e AS em pacientes com DAC.

Notavelmente, a VN é uma glicoproteína plasmática multifuncional com um domínio de ligação múltipla, que regula processos como adesão plaquetária, agregação e coagulação. Além disso, a VN pode ser expressa e produzida na parede do vaso, predominantemente em lesões ateroscleróticas.²⁵ Estudos posteriores mostraram que o PAI-1 estimula a expressão de VN nas SMCs pela ligação da proteína-1 relacionada a receptor de LDL (LRP1) e controla a expressão da VN vascular in vivo. Portanto, a regulação autócrina da expressão da VN vascular pelo PAI-1 pode desempenhar papéis importantes na homeostase vascular e no remodelamento vascular patológico.²⁶ Vários estudos encontraram uma função regulatória para a VN na resposta hemostática à lesão vascular.⁹ Além disso, a VN liga-se ao PAI-1 e ajusta sua ação estabilizando a conformação do PAI-1 ativo, e potencialmente controla a depuração do PAI-1.²⁷ Foram encontrados níveis séricos de VN aumentados em pacientes com DAC quando comparados com os controles.^{9,11} Derer et al.,²⁶ sugeriram que a VN é um biomarcador clinicamente útil para desfechos cardiovasculares desfavoráveis em pacientes após implante de *stent* submetidos a intervenções coronarianas.²⁶ Portanto, a VN pode servir como um marcador para DAC, e níveis elevados podem indicar seu papel no diagnóstico e/ou progressão da DAC.

Tabela 1 – Características gerais dos grupos de estudo

Característica	Controle	Sem Estenose	1VD	2VD	3VD	Valor de p
Tamanho da amostra	20	40	40	40	40	-
Idade (média (DP))	57,5 (3,2)	58,80 (7,5)	58,9 (7,9)	61,0 (11,8)	60,5 (10,5)	0,37*
Sexo (masculino / feminino)	17/3	21/19	31/9	30 /10	25/15	0,30**
Tabagismo (n (%))	0 (0%)	13 (32,5)	19 (47,5)	16 (40)	24 (60)	0,004**
Hipertensão (n (%))	0 (0%)	25 (62,5)	26 (65)	12 (30)	19 (47,5)	0,01**
Diabetes (n (%))	0 (0%)	7 (17,5%)	11 (27,5%)	12 (30%)	15 (37,5%)	0,02**

* Análise de variância unidirecional; ** Teste do qui quadrado. 1VD: Estenose em um dos vasos, 2VD: Estenose em dois dos vasos, 3VD: Estenose em três dos vasos.

Tabela 2 – Comparação dos níveis séricos médios de fatores de risco cardiovascular entre subgrupos categorizados com base no número de vasos ocluídos de pacientes com DAC

Valor de p	3VD	2VD	1VD	Sem Estenose	Controle	Variável
0,001*	3,13 ± 0,42	2,76 ± 0,38	2,62 ± 0,27	2,28 ± 0,32	1,41 ± 0,22	OX-LDL (ug/mL) ¹
0,001*	7,12 ± 1,21	6,39 ± 0,66	5,25 ± 0,98	5,20 ± 0,44	4,32 ± 0,86	MDA (mmol/mL) ¹
0,001*	86,8 ± 6,8	76,9 ± 4,7	75 ± 14,2	51,5 ± 10,8	41,7 ± 11,9	PAI-1 (ng/mL) ¹
0,001**	361 (95,75)	264 (100,75)	304 (184,25)	208 (61,75)	200 (26)	VN (ng/mL) ²
0,001**	5,23 (1,05)	7,53 (0,86)	5,21 (0,39)	1,52 (1,03)	2,54 (0,78)	PCR-as (mg/dL) ²
0,001*	169,9 ± 15,3	138,3 ± 12,3	108,6 ± 9,2	60 ± 11,6	51,0 ± 5,0	AS (mg/dL) ¹

OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; MDA: malondialdeído; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; VN: vitronectina; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade; AS: ácido siálico; 1VD: Estenose em um dos vasos, 2VD: Estenose em dois dos vasos, 3VD: Estenose em três dos vasos. ¹ média ± desvio padrão; ² mediana (intervalo interquartil). Realizado teste ANOVA. ** Realizado teste de Kruskal-Wallis.

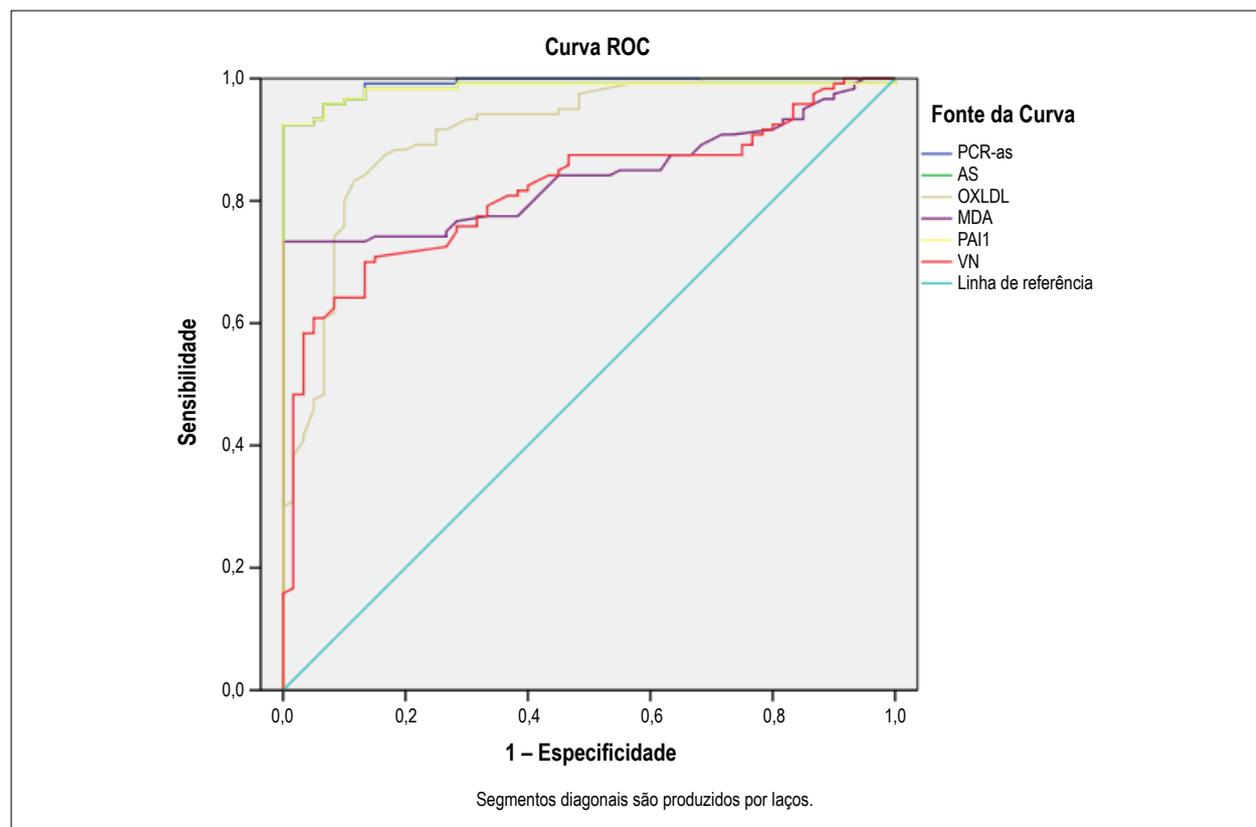


Figura 1 – Análise ROC de VN, MDA, OX-LDL, PAI-1, PCR-as e AS. VN: vitronectina; MDA: malondialdeído; OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade; AS: ácido siálico.

Tabela 3 – Área sob Curva do ROC

Variável de teste	Área	SD ^a	Valor de p ^b	Intervalo de Confiança 95% Assintótico	
				Limite inferior	Limite superior
OX-LDL	0.870	0.032	.000	0.806	0.934
MDA	0.804	0.034	.000	0.738	0.869
PAI-1	0.951	0.010	.000	0.921	0.992
VN	0.799	0.036	.000	0.729	0.869
AS	0.962	0.021	.000	0.921	0.998
PCR-as	0.971	0.032	.000	0.953	0.995

Nota: ^a. Sob a hipótese não paramétrica, ^b. Hipótese nula: área verdadeira = 0. OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; MDA: malondialdeído; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; VN: vitronectina; AS: ácido siálico; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade.

Tabela 4 – Eficácia diagnóstica dos parâmetros

Índice	Crítérios positivos	Sensibilidade/%	Especificidade/%	Falso negativo/%	Falso positivo/%
AS	≥ 89,7 (mg/dL)	94	96	6	4
PCR-as	≥ 3,4 (mg/dL)	94	93	6	7
PAI-1	≥ 67 (ng/mL)	92	90	8	10
VN	≥ 254 (ng/mL)	70	83	30	17
OX-LDL	≥ 2,67 (ug/mL)	70	75	30	25
MDA	≥ 5,49 (mmol/mL)	74	77	26	23

OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; MDA: malondialdeído; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; VN: vitronectina; AS: ácido siálico; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade.

Tabela 5 – Ensaio combinado de PAI-1, VN, OX-LDL, MDA, AS e PCR-as

Índice	Sensibilidade/%	Especificidade/%
OX-LDL, MDA, PAI-1, AS, PCR-as	97	95
OX-LDL, MDA, AS, PCR-as, VN	98	97
OX-LDL, VN, PAI-1, AS, PCR-as	98	97
VN, MDA, PAI-1, AS, PCR-as	97	97
OX-LDL, MDA, PAI-1, VN, AS, PCR-as	99	99

OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; MDA: malondialdeído; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; VN: vitronectina; AS: ácido siálico; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade.

Notavelmente, sugere-se que altas concentrações plasmáticas de PAI-1 estão relacionadas com a progressão das síndromes coronarianas e o desenvolvimento de infarto do miocárdio.^{26,28} Estudos clínicos e experimentais demonstraram que a deficiência de PAI-1 em humanos é acompanhada por sangramento anormal, enquanto que níveis plasmáticos elevados de PAI-1 estão associados à trombose vascular, indicando o papel crucial do PAI-1 na estabilização de coágulos hemostáticos.¹³ Além disso, estudos anteriores mostraram que os níveis de PAI-1 são significativamente elevados em pacientes com DAC em comparação com controles, e também tem relação significativa com a gravidade da doença.^{20,29} Além disso, foi relatado que o PAI-1 é um preditor independente de disfunção microvascular coronária na hipertensão.³⁰ Nossos resultados sugerem que níveis proeminentes de concentrações de PAI-1 podem ser preditores e marcadores de diagnóstico para DAC.

Além disso, o estresse oxidativo tem um papel importante no início e na progressão da aterosclerose. O OX-LDL é mais aterogênico do que o LDL nativo, e se reconheceu que ele se acumula em lesões ateroscleróticas na aorta e nas artérias coronárias de pacientes com DAC.^{2,8,17} Além disso, o MDA é produzido a partir da quebra dos lipídios durante os processos de peroxidação, e o MDA sérico é um marcador confiável de danos oxidativos. Achados anteriores também confirmaram o envolvimento da peroxidação lipídica na DAC, referindo-se aos níveis plasmáticos de MDA observados em pacientes com DAC quando comparados com controles saudáveis. Estudos transversais mais recentes demonstraram uma relação positiva entre níveis elevados de OX-LDL e MDA e a gravidade das síndromes coronarianas agudas.^{20,31} Ebara et al.³² relataram que o nível plasmático de OX-LDL em pacientes com DAC aumenta em aproximadamente 3,5 vezes em relação aos

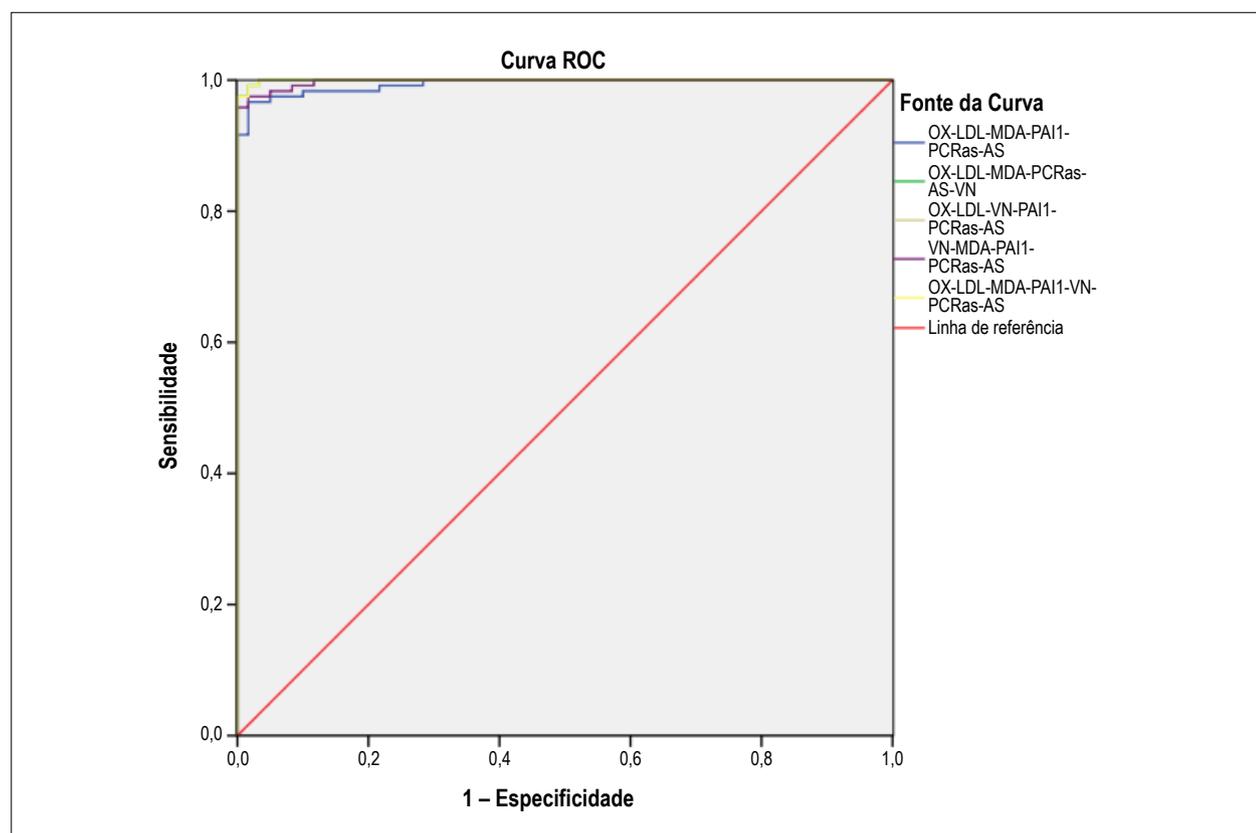


Figura 2 – Curva ROC do ensaio combinado. VN: vitronectina; MDA: malondialdeído; OX-LDL: lipoproteína de baixa densidade oxidativa; PAI-1: inibidor do ativador do plasminogênio-1; PCR-as: proteína C-reativa de alta sensibilidade; AS: ácido siálico.

controles saudáveis.³² Notavelmente, os resultados deste estudo indicaram que ambos os parâmetros de estresse oxidativo podem ser usados como marcadores de diagnóstico de DAC, e o impacto desse estresse oxidativo pode progredir para um evento aterosclerótico. Impressionantemente, na lesão arterial acompanhada de resposta inflamatória, a inflamação desempenha um papel fundamental na patogênese da DAC e seus impedimentos. Assim, AS e PCR-as ganharam importância como marcadores inflamatórios indicadores e preditores do processo das síndromes coronarianas agudas.^{19,33} O aumento da produção de reagentes isolados de fase aguda aumenta os níveis de AS. O AS está associado à aterosclerose independentemente de outros fatores de risco cardiovasculares.¹⁵ Estudos anteriores relataram níveis séricos totais de AS elevados em pacientes com síndrome coronariana aguda quando comparados a controles saudáveis.³⁴ Especificamente, Govindarajan et al.,¹⁴ demonstraram que o nível total de AS plasmático foi significativamente maior em pacientes com infarto do miocárdio do que naqueles com angina instável e estável. Em um estudo recente com seguimento de 17 anos, níveis séricos elevados de AS foram preditivos de eventos cardiovasculares em indivíduos aparentemente saudáveis.³⁵ Além disso, vários estudos sugeriram uma relação positiva entre PCR-as e DAC em indivíduos saudáveis.^{36,37} Mahajan et al.,³⁸ encontraram relação entre marcadores inflamatórios e o envolvimento da artéria coronária em pacientes diabéticos portadores de

DAC precoce.³⁸ Além disso, muitas evidências indicaram que a PCR-as é um marcador sistêmico cautelosamente sensível para o diagnóstico de inflamação e um marcador preditivo útil e potente de eventos cardiovasculares.^{11,39} Este estudo mostrou que os níveis séricos de PCR-as e de AS podem ser usados como biomarcadores preditivos ou de diagnóstico em pacientes com DAC.

Os achados deste estudo mostraram níveis séricos elevados de LDL-OX, MDA, PAI-1, VN, PCR-as e AS em pacientes com DAC quando comparados a indivíduos saudáveis. A PCR-as, o AS e o PAI-1 tiveram a melhor sensibilidade e especificidade, sugerindo o valor desses biomarcadores em pacientes com diagnóstico de DAC. A análise da curva ROC mostrou poder diagnóstico satisfatório de todos esses seis índices, do maior para o menor: AS, PCR-as, PAI-1, OX-LDL, MDA e VN.

Este estudo também considerou o valor diagnóstico do ensaio combinado para todos os índices para o melhor valor diagnóstico confirmativo, incluindo PCR-as, AS, PAI-1, OX-LDL, MDA e VN, resultando em valores elevados de sensibilidade e especificidade, sem diminuição significativa do valor preditivo negativo. Estes resultados embasaram o papel complementar do ensaio combinado no diagnóstico da DAC.

Uma das limitações deste estudo é a probabilidade de uma amostra não representativa na tentativa de selecioná-la aleatoriamente, uma vez que o hospital é um hospital de referência e os pacientes procuravam esse hospital em dias especiais, o que pode levar ao viés de seleção.

Além disso, este estudo é apenas transversal, o que pode não mostrar relações temporais e, portanto, as associações observadas podem não ser necessariamente causais.

Conclusões

No presente estudo, altas concentrações séricas de AS ($\geq 7/89$ mg/dL), PCR-as ($\geq 3,4$ mg/dL), PAI-1 (≥ 67 ng/mL) e aumento de OX-LDL, MDA, e VN foram encontrados para ser preditores significativos independentes de CAD em pacientes. Além disso, os resultados sugeriram que o uso de níveis séricos de PCR-as, AS, PAI-1, OX-LDL, MDA e VN pode ser útil no monitoramento clínico. O ensaio combinado de PAI-1, OX-LDL, MDA e VN séricos pode melhorar a sensibilidade e especificidade para o diagnóstico de DAC, e pode ser usado para triagem populacional e para monitoramento de pacientes com DAC. Portanto, embora sugerimos o uso desses biomarcadores como um instrumento de diagnóstico para pacientes com DAC, eles precisam ser mais explorados para confirmar essa sugestão.

Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa e Obtenção de financiamento: Abolhasani S; Obtenção de dados: Mahmoodi N; Análise e interpretação dos dados: Shahbazloo SV; Análise estatística: Saadati HM; Redação do manuscrito: Abolhasani S,

Khanbabaei N; Revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Khanbabaei N.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de financiamento

O presente estudo Comitê de Pesquisa de Estudantes, School of Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Irã.

Vinculação acadêmica

Não há vinculação deste estudo a programas de pós-graduação.

Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Medical Faculty of the Tabriz University of Medical Sciences sob o número de protocolo 91/2-3/5. Todos os procedimentos envolvidos nesse estudo estão de acordo com a Declaração de Helsinki de 1975, atualizada em 2013. O consentimento informado foi obtido de todos os participantes incluídos no estudo.

Referências

1. Finegold JA, Asaria P, Francis DP. Mortality from ischaemic heart disease by country, region, and age: statistics from World Health Organisation and United Nations. *Int J Cardiol.* 2013;168(2):934-45.
2. Itabe H, Obama T, Kato R. The dynamics of oxidized LDL during atherogenesis. *J Lipids.* 2011;2011:418313.
3. Derer W, Barnathan ES, Safak E, Agarwal P, Heidecke H, Möckel M, et al. Vitronectin concentrations predict risk in patients undergoing coronary stenting. *Circ Cardiovasc Interv.* 2009;2(1):14-9.
4. Prasad K. C-Reactive protein (CRP)-lowering agents. *Cardiovasc Drug Rev.* 2006;24(1):33-50.
5. Varma V, Varma M, Varma A, Kumar R, Bharosay A, Vyas S. Serum total sialic acid and highly sensitive C-reactive protein: Prognostic markers for the diabetic nephropathy. *J Lab Physicians.* 2016;8(1):25-9.
6. Vitulli P, Tanzilli G, Marullo AG, Peruzzi M, Zoccai GB. Inflammation and oxidative stress in acute coronary syndromes: a continuum from plaque vulnerability to thrombus formation. *Enliven Clin Cardiol Res.* 2014;1(1):1-7.
7. Ferrari E, Lutgens E, Weber C, Gerdes N. Atherosclerosis: cell biology and lipoproteins focus on epigenetic modification and macrophage biology. *Curr Opin Lipidol.* 2017;28(2):220-1.
8. Zhao X, Zhang HW, Xu RX, Guo YL, Zhu CG, Wu NQ, et al. Oxidized-LDL is a useful marker for predicting the very early coronary artery disease and cardiovascular outcomes. *Per Med.* 2018;15(6):521-9.
9. Ekmekçi ÖB, Ekmekçi H. Vitronectin in atherosclerotic disease. *Clin Chim Acta.* 2006;368(1-2):77-83.
10. Ekmekçi H, Sonmez H, Ekmekçi OB, Ozturk Z, Domanic N, Kokoglu E. Plasma vitronectin levels in patients with coronary atherosclerosis are increased and correlate with extent of disease. *J Thromb Thrombolysis.* 2002;14(3):221-5.
11. Yaghoubi A, Ghojzadeh M, Abolhasani S, Alikhah H, Khaki-Khatibi F. Correlation of serum levels of vitronectin, malondialdehyde and Hs-CRP with disease severity in coronary artery disease. *J Cardiovasc Thorac Res.* 2015;7(3):113-7.
12. Tjärnlund-Wolf A, Brogren H, Lo EH, Wang X. Plasminogen activator inhibitor-1 and thrombotic cerebrovascular diseases. *Stroke.* 2012;43(10):2833-9.
13. Cesari M, Pahor M, Incalzi RA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1): a key factor linking fibrinolysis and age-related subclinical and clinical conditions. *Cardiovasc Ther.* 2010;28(5):e72-91.
14. Govindarajan S, Raghavan VM, Rao ACV. Plasma Myeloperoxidase and total sialic acid as prognostic indicators in acute coronary syndrome. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(8):BC09-13.
15. Khaki-Khatibi F, Sadeghi Z, Yaghoubi A, Ashoori MR, Gharebaba RP. Relationship between serum levels of total sialic acid, mda-ldl, and hs-crp with extension of coronary artery disease, in nonsmoker and nondiabetic patients. *World J Pharm Pharm Sci.* 2015;5(2):294-305.
16. Gökmen SS, Kiliçli G, Özçelik F, Gülen S. Serum total and lipid-bound sialic acid levels following acute myocardial infarction. *Clin Chem Lab Med.* 2000;38(12):1249-55.
17. Maes M, Mihaylova I, Kubera M, Uytterhoeven M, Vrydags N, Bosmans E. Increased plasma peroxides and serum oxidized low density lipoprotein antibodies in major depression: markers that further explain the higher incidence of neurodegeneration and coronary artery disease. *J Affect Disord.* 2010;125(1):287-94.

18. Chen C, Khismatullin DB. Oxidized low-density lipoprotein contributes to atherogenesis via co-activation of macrophages and mast cells. *PloS One*. 2015;10(3):e0123088.
19. Galkina E, Ley K. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:165-97.
20. Khaki-Khatibi F, Mahmoodi N, Abolhasani S, Gharebaba RP. Correlation of fibrinolysis marker of plasma plasminogen activator inhibitor type-1 and oxidative stress parameters in occurrence and progression of coronary artery disease. *Bull Env Pharmacol Life Sci*. 2014;3(7):27-33.
21. Khaki-Khatibi F, Gharebaba RP, Yaghoubi A, Farajzade A, Mahmoodi N, Abolhasani S. Relationship between serum levels of fibronectin, leptin and hs-CRP with extension of coronary artery disease. *Bull Env Pharmacol Life Sci*. 2014;3(7):40-6.
22. Singh RB, Mengi SA, Xu YJ, Arneja AS, Dhalla NS. Pathogenesis of atherosclerosis: a multifactorial process. *Exp Clin Cardiol*. 2002;7(1):40-53.
23. Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol*. 2003;91(3A):3A-6A.
24. Nigam PK, Narain VS, Chandra N, Puri VK, Saran RK, Dwivedi SK, et al. Serum and platelet sialic acid in acute myocardial infarction. *Indian J Clin Biochem*. 1995;10(2):106-9.
25. Dufourcq P, Louis H, Moreau C, Daret D, Boisseau M, Lamazière JMD, et al. Vitronectin expression and interaction with receptors in smooth muscle cells from human atheromatous plaque. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1998;18(2):168-76.
26. Luo M, Ji Y, Luo Y, Li R, Fay WP, Wu J. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates the vascular expression of vitronectin. *J Thromb Haemost*. 2017;15(12):2451-60.
27. Cao DJ, Guo YL, Colman RW. Urokinase-type plasminogen activator receptor is involved in mediating the apoptotic effect of cleaved high molecular weight kininogen in human endothelial cells. *Circ Res*. 2004;94(9):1227-34.
28. Forood A, Malekpour-Afshar R, Mahdavi A. Serum level of plasminogen activator inhibitor type-1 in addicted patients with coronary artery disease. *Addict Health*. 2014;6(3-4):119-26.
29. Båvenholm P, De Faire U, Landou C, Efendic S, Nilsson J, Wiman B, et al. Progression of coronary artery disease in young male post-infarction patients is linked to disturbances of carbohydrate and lipoprotein metabolism and to impaired fibrinolytic function. *Eur Heart J*. 1998;19(3):402-10.
30. Naya M, Tsukamoto T, Inubushi M, Morita K, Katoh C, Furumoto T, et al. Elevated plasma plasminogen activator inhibitor type-1 is an independent predictor of coronary microvascular dysfunction in hypertension. *Circ J*. 2007;71(3):348-53.
31. Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, et al. Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(5):844-8.
32. Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, et al. Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation*. 2001;103(15):1955-60.
33. Crook M, Lumb P, Andrews V, Swaminathan R. Serum total sialic acid, a reputed cardiovascular risk factor, and its relationship to lipids, plasma fasting insulin, blood pressure and body mass index in normal individuals. *Clin Sci*. 1998;95(1):53-7.
34. Serdar Z, Serdar A, Altin A, Eryilmaz U, Albayrak S. The relation between oxidant and antioxidant parameters and severity of acute coronary syndromes. *Acta Cardiol*. 2007;62(4):373-80.
35. Knuiman MW, Watts GF, Divitini ML. Is sialic acid an independent risk factor for cardiovascular disease? A 17-year follow-up study in Busselton, Western Australia. *Ann Epidemiol*. 2004;14(9):627-32.
36. Ghodke SS, Padalkar RK, Bhagat SS. hs-CRP: A "golden marker" of inflammation and coronary artery disease. *Int J Health Sci Res*. 2012;2(6):42-6.
37. Sharma SB, Garg S, Veerwal A, Dwivedi S. hs-CRP and oxidative stress in young CAD patients: a pilot study Indian J Clin Biochem. 2008;23(4):334-6.
38. Mahajan N, Malik N, Bahl A, Sharma Y, Dhawan V. Correlation among soluble markers and severity of disease in non-diabetic subjects with premature coronary artery disease. *Mol Cell Biochem*. 2009;330(1-2):201-9.
39. Arroyo-Espiguero R, Avanzas P, Cosin-Sales J, Aldama G, Pizzi C, Kaski JC. C-reactive protein elevation and disease activity in patients with coronary artery disease. *Eur Heart J*. 2004;25(5):401-8.

