

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**AVALIAÇÃO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS E
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES PARA DETECÇÃO DE
TROPONINA T E PROTEÍNA C REATIVA**

LAÍSE OLIVEIRA RESENDE

Uberlândia
2016

LAÍSE OLIVEIRA RESENDE

**AVALIAÇÃO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS E
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSORES PARA DETECÇÃO DE
TROPONINA T E PROTEÍNA C REATIVA**

Tese apresentada à Universidade Federal de
Uberlândia como requisito para a obtenção do
título de Doutora em Ciências.

Orientador: Adriano de Oliveira Andrade

Coorientador: Elmiro Santos Resende

Uberlândia
2016

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

R433
2016 Resende, Laíse Oliveira, 1987-
Avaliação de sinais eletrofisiológicos e desenvolvimento de
imunossensores para detecção de troponina T e proteína C reativa
[recurso eletrônico] / Laíse Oliveira Resende. - 2016.

Orientador: Adriano de Oliveira Andrade.

Coorientador: Elmiro Santos Resende.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-
graduação em Engenharia Elétrica.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.326>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Engenharia elétrica. I. Andrade, Adriano de Oliveira, 1975-,
(Orient.). II. Resende, Elmiro Santos, 1954-, (Coorient.). III.
Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em
Engenharia Elétrica. IV. Título.

CDU: 621.3

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091

Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

**AVALIAÇÃO DE SINAIS ELETROFISIOLÓGICOS E
DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE
TROPONINA T E PROTEÍNA C REATIVA**

LAÍSE OLIVEIRA RESENDE

Tese apresentada à Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para a
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Banca Examinadora:

Adriano de Oliveira Andrade - Orientador (UFU)

Elmiro Santos Resende - Coorientador (UFU)

João Marcos Madurro (UFU)

André Schmidt (USP)

Marcus Vinicius Simões (USP)

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me abençoar e permitir mais essa conquista em minha vida.

Aos meus pais, Celso e Ilsa, toda compreensão, amor, força e incentivo foram essenciais para a realização desse trabalho. Obrigada pelo apoio incondicional, pelas orações constantes, por serem meu alicerce e minha maior força.

Ao meu irmão, Alysso, agradeço pela amizade em todos os momentos, torcida e alegria compartilhada a cada vitória.

Ao meu namorado, Paulo Henrique, agradeço pelo companheirismo e apoio constante. Obrigada por estar sempre ao meu lado, acreditando no meu potencial e fazendo meus dias mais felizes.

Aos meus familiares e amigos, que estiveram presentes em todos os momentos e também àqueles que apesar da distância torceram pelo meu sucesso.

Ao meu orientador, Adriano de Oliveira Andrade, pelo apoio durante a realização desse trabalho, principalmente nas pesquisas relacionadas ao processamento de sinais eletrocardiográficos, desenvolvimento de *softwares* e análise de entropia.

Ao meu coorientador, Elmiro Santos Resende, pela colaboração no decorrer da pesquisa e pelos ensinamentos referentes à cardiologia e à análise de sinais eletrofisiológicos, que tanto contribuíram para a realização desse trabalho.

À professora Ana Graci Brito Madurro, por disponibilizar o Laboratório de Biossensores para o desenvolvimento dos imunossensores e pelo auxílio durante a realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório, pela colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia, por possibilitar a coleta dos dados eletrocardiográficos e das amostras de soro humano para análise dos marcadores moleculares de lesão miocárdica.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro a essa pesquisa.

RESUMO

O eletrocardiograma (ECG) é um dos exames complementares de maior capacidade informativa utilizado para realização do diagnóstico, avaliação da gravidade e planejamento terapêutico na síndrome coronária aguda. Além das alterações eletrocardiográficas, observa-se a importância da quantificação de marcadores moleculares de lesão miocárdica e marcadores de inflamação. A detecção destes pode ser realizada de forma otimizada a partir do desenvolvimento de biossensores, que apresentam capacidade de detecção em tempo real, com elevada especificidade, seletividade e sensibilidade.

O objetivo central desta pesquisa consiste na avaliação de medidas quantitativas de sinais eletrocardiográficos realizados em pacientes acometidos por infarto do miocárdio e em pacientes sem alterações relacionadas à síndrome coronária aguda, além do desenvolvimento de imunossensores para detecção de biomarcadores relacionados ao infarto do miocárdio, troponina T (TnT) e proteína C reativa (PCR).

Os dados utilizados foram eletrocardiogramas e marcadores moleculares de lesão miocárdica. Primeiramente, foi desenvolvido um *software* para a digitalização dos sinais eletrocardiográficos, para posterior cálculo e análise da entropia dos eletrocardiogramas. Além disso, o desenvolvimento de imunossensores para detecção e quantificação de PCR e TnT, possibilita a avaliação dos marcadores moleculares de lesão miocárdica. A partir da obtenção de sinais eletrofisiológicos e dos valores dos biomarcadores a partir de imunossensores, é possível a realização do diagnóstico, avaliação e acompanhamento da evolução dos pacientes. Os resultados deste estudo podem contribuir para o aprimoramento dos métodos diagnósticos e para melhor prognóstico do infarto agudo do miocárdio.

Palavras-chave: eletrocardiograma, entropia, imunossensores, troponina T, proteína C reativa.

ABSTRACT

The electrocardiogram (ECG) is one of the complementary exams with most informative capacity used for diagnosis, assessment of severity and treatment planning in acute coronary syndrome. In addition to the electrocardiographic changes, it is observed the importance of quantification of molecular markers of myocardial injury and inflammation markers. The detection the biomarkers may be performed in an optimized way from the development of biosensors, which have detection capability in real time with high specificity, selectivity and sensitivity.

The main objective of this research is to evaluate quantitative measures of electrocardiographic signs performed in patients affected by myocardial infarction and in patients without changes related to acute coronary syndrome, and the development of immunosensors for detection of biomarkers related to myocardial infarction, troponin T (TnT) and C-reactive protein (CRP).

The data were electrocardiogram and molecular markers of myocardial injury. Initially, it was developed a software to obtain digital electrocardiographic signals for further calculation and analysis of the entropy of electrocardiograms. Furthermore, from the development of immunosensors for detection and quantitation of CRP and cTnT, it becomes possible to evaluate molecular markers of myocardial injury. From obtaining electrophysiological signals and values of biomarkers from immunosensors, it is possible the diagnosis, evaluation and monitoring of patient outcomes. The results of this study can contribute to the improvement of diagnostic methods and better prognosis of acute myocardial infarction.

Keywords: electrocardiogram, entropy, immunosensors, troponin T, C-reactive protein.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO	21
	2.1 Introdução	21
	2.2 Alterações eletrocardiográficas	23
	2.2.1 Isquemia	23
	2.2.2 Lesão.....	24
	2.2.3 Necrose	24
	2.3 Fisiopatologia	26
	2.3.1 Eletrofisiologia	26
	2.3.2 Morte celular na cardiopatia isquêmica.....	30
	2.4 Patogênese	31
	2.5 Etiopatogenia	32
	2.6 Evolução eletrocardiográfica.....	33
	2.7 Localização eletrocardiográfica	34
	2.8 Diagnóstico	34
	2.8.1 Exame clínico	35
	2.8.2 Alterações eletrocardiográficas	35
	2.8.3 Biomarcadores	36
	2.9 Prognóstico	45

2.10	Tipos de tratamento	45
2.10.1	Reperusão química	46
2.10.2	Reperusão mecânica	46
3	BIOSSENSORES ASSOCIADOS À SÍNDROME CORONÁRIA AGUDA	48
3.1	Introdução	48
3.2	Biossensores.....	49
3.3	Sistemas e tecnologias existentes	51
3.4	Biossensores para detecção de troponinas	52
3.5	Biossensores para detecção de proteína C reativa.....	54
3.6	Conclusão e perspectivas	55
4	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA.....	56
4.1	Introdução	56
4.2	Experimentos	59
4.2.1	Materiais	59
4.2.2	Equipamentos	59
4.2.3	Coleta de soro humano e quantificação da proteína C reativa	60
4.2.4	Imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de ouro <i>screen printed</i>	60
4.2.5	Imunossensor desenvolvido com a utilização de ressonância de plasma de superfície.....	61
4.2.6	Curva de calibração	62
4.3	Resultados e discussão.....	63
4.3.1	Caracterização eletroquímica do imunossensor	63
4.3.2	Curva de calibração eletroquímica	64
4.3.3	Detecção de proteína C reativa em soro humano	67

4.4	Conclusão	73
5	DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA DETECÇÃO DE TROPONINA T	75
5.1	Introdução	75
5.2	Experimentos	76
5.2.1	Materiais	76
5.2.2	Equipamentos	76
5.2.3	Coleta de soro humano e quantificação da troponina T	76
5.2.4	Imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de grafite <i>screen printed</i>	77
5.2.5	Curva de calibração	78
5.3	Resultados e discussão.....	79
5.3.1	Curva de calibração eletroquímica	79
5.3.2	Detecção de troponina T em soro humano	81
5.4	Conclusão	83
6	DESENVOLVIMENTO DE UM <i>SOFTWARE</i> PARA DIGITALIZAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA.....	84
6.1	Introdução	84
6.2	Materiais e Métodos	85
6.3	Resultados	88
6.4	<i>Software</i> ECGLab	89
6.5	Processamento de imagens.....	89
6.6	Resultados	90
6.6.1	Realização das medidas manuais e automáticas.....	90
6.6.2	Validação do <i>software</i>	93
6.7	Conclusão	97

7	AVALIAÇÃO DA ENTROPIA DOS SINAIS ELETROCARDIOGRÁFICOS	98
7.1	Introdução	98
7.2	Materiais e métodos.....	99
7.2.1	Caracterização do estudo	99
7.2.2	Extração de características de entropia.....	99
7.3	Resultados referentes aos testes iniciais	101
7.4	Resultados referentes à avaliação da entropia para 60 pacientes	104
7.5	Discussão	116
7.6	Conclusão	117
8	CONCLUSÃO.....	119

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Representação esquemática da obstrução aterosclerótica, a alteração aguda na placa, o trombo superposto e a lesão miocárdica no IAM (ROBBINS, 1996).....	22
Figura 2.2. Efeitos da corrente de lesão causadas por isquemia transmural (A) e subendocárdica (B) (KATZ, 1992).	28
Figura 2.3. Onda Q registrada durante a propagação da onda de despolarização numa região de necrose transmural (KATZ, 1992).	29
Figura 2.4. Representação esquemática de proteínas envolvidas na contração muscular - actina, tropomiosina e troponinas I, C e T.	38
Figura 2.5. Estrutura tridimensional da troponina T humana (Protein Data Bank in Europe, 2014).....	39
Figura 2.6. Tempo de elevação das troponinas T e I.....	41
Figura 2.7. Modelo tridimensional da estrutura homopentamérica da PCR. As entidades não-poliméricas são íons cálcio e fosforilcolina (Protein Data Bank in Europe, 2014).....	42
Figura 2.8. Estratificação de risco cardíaco de acordo com a concentração de PCR detectada no sangue (Adaptado de RIDKER, 2003).	44
Figura 3.1. Configuração de um biossensor.	49
Figura 3.2. Principais componentes de um biossensor.....	50
Figura 4.1. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de ouro screen printed.....	61
Figura 4.2. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de ressonância de plasma de superfície.....	62
Figura 4.3. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo <i>screen-printed</i> limpo (A), modificado com anti-PCR ($12,5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$) (B), utilizando o de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, $5 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$) em cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$) como mediador eletroquímico, pH 7.4. Modulação de amplitude: 25mV. Intervalo de pulso: 0,2s; $20\text{mV}.\text{s}^{-1}$..	63

Figura 4.4. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo <i>screen-printed</i> modificado com anti-PCR ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) incubado com concentrações diferentes de PCR, usando o de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como indicador eletroquímico.	65
Figura 4.5. Curva de calibração obtida a partir do sinal do ferrocianeto de potássio após interação antígeno-anticorpo.	65
Figura 4.6. Sequência de aminoácidos da proteína C reativa.	66
Figura 4.7. Gráfico de barras utilizando o sinal de oxidação a partir do ferrocianeto de potássio. Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados nas seguintes condições: solução eletrolítica de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), Amplitude de modulação: 25 mV . Pulso Intervalo: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1}	68
Figura 4.8. Discriminação angular entre os soros positivo e negativo para proteína C reativa.	69
Figura 4.9. Média e desvio padrão da triplicata realizada com soro humano positivo e negativo para proteína C reativa.....	69
Figura 4.10. Microscopia de forma atômica. A: Eletrodo de ouro sem biomolécula; B: Eletrodo de ouro com anti-PCR; C: Sonda com soro humano negativo; D: Sonda com soro humano positivo.	70
Figura 4.11. Diagrama de Nyquist para a espectroscopia de impedância eletroquímica em $5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de solução de KCl . Os testes foram realizados para um eletrodo de ouro <i>screen printed</i> descoberto e para um eletrodo de ouro <i>screen printed</i> /anti-PCR. $E_{\text{ap}} = + 0,12 \text{ V}$; amplitude = 10 mV ; faixa de frequência = 100 kHz a 10 Hz	71
Figura 4.12. Diagrama de Nyquist para espectroscopia de impedância eletroquímica em $5 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl . Os testes foram realizados para um eletrodo de ouro/ anti-PCR/soro negativo e ouro/anti-PCR/soro positivo. $E_{\text{ap}} = + 0,12 \text{ V}$; amplitude = 10 mV ; faixa de frequência = 100 kHz a 10 Hz	72
Figura 4.13. Circuito elétrico equivalente. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência a transferência de carga; CPE: elemento de fase constante; W: impedância Warburg.....	72
Figura 5.1. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de grafite <i>screen printed</i>	78
Figura 5.2. Sequência de aminoácidos da troponina T.....	78
Figura 5.3. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo <i>screen-printed</i> modificado com anti-troponina T (10 ng.mL^{-1}) incubado com concentrações diferentes de troponina T, usando	

o ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$, 5 mmol.L ⁻¹) e cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol.L ⁻¹) como indicador eletroquímico.	79
Figura 5.4. Curva de calibração obtida a partir do sinal do ferrocianeto de potássio após interação antígeno-anticorpo.	80
Figura 5.5. Gráfico de barras utilizando o sinal de oxidação a partir do ferrocianeto de potássio. Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados nas seguintes condições: solução eletrolítica de ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$, 5 mmol.L ⁻¹) e cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol.L ⁻¹), Amplitude de modulação: 25 mV. Pulso Intervalo: 0,2 s; 20 mV s ⁻¹	81
Figura 5.6. Microscopia de forma atômica. A: Eletrodo de grafite sem biomolécula; B: Eletrodo de grafite com anti-troponina T; C: Sonda com soro humano negativo; D: Sonda com soro humano positivo.	82
Figura 6.1. Interface do usuário desenvolvida para a digilitização de sinais eletrocardiográficos.	86
Figura 6.2. Exemplo de uma derivação escaneada.....	87
Figura 6.3. Digitalização de uma derivação eletrocardiográfica impressa.....	88
Figura 6.4. Sinal eletrocardiográfico digitalizado (Matlab).	88
Figura 7.1. Soma das entropias das derivações.	101
Figura 7.2. Média das entropias das derivações.	102
Figura 7.3. Análise da entropia do primeiro eletrocardiograma normal selecionado.....	102
Figura 7.4. Análise da entropia do segundo eletrocardiograma normal selecionado.....	103
Figura 7.5. Análise da entropia do primeiro eletrocardiograma selecionado de um paciente acometido por infarto do miocárdio.	103
Figura 7.6. Análise da entropia do segundo eletrocardiograma selecionado de um paciente acometido por infarto do miocárdio.	104
Figura 7.7. Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas normais.	114
Figura 7.8. Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas de pacientes acometidos por IAM anterior.....	115
Figura 7.9. Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas de pacientes acometidos por IAM inferior.	115

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1. Localização eletrocardiográfica do IAM (KATZ, 1992).....	34
Tabela 4.1. Valores dos elementos do circuito equivalente.	73
Tabela 6.1. Medidas das durações da onda P.	90
Tabela 6.2. Medidas das durações do intervalo QRS.....	90
Tabela 6.3. Medidas das durações da onda T.....	91
Tabela 6.4. Test t para duração da onda P.....	92
Tabela 6.5. Test t para duração do intervalo QRS.....	92
Tabela 6.6. Test t para duração da onda T.....	92
Tabela 6.7. Duração da onda P referente à derivação D2 para 10 pacientes.....	93
Tabela 6.8. Amplitude da onda P referente à derivação D2 para 10 pacientes.	93
Tabela 6.9. Duração do intervalo PR referente à derivação D2 para 10 pacientes.	94
Tabela 6.10. Duração do intervalo QRS referente à derivação D2 para 10 pacientes.....	94
Tabela 6.11. Amplitude da onda R referente à derivação D2 para 10 pacientes.....	94
Tabela 6.12. Duração da onda T referente à derivação D2 para 10 pacientes.....	95
Tabela 6.13. Amplitude da onda T referente à derivação D2 para 10 pacientes.	95
Tabela 6.14. Test t para duração da onda P.....	96
Tabela 6.15. Test t para amplitude da onda P.....	96
Tabela 6.16. Test t para duração do intervalo PR.....	96
Tabela 6.17. Test t para duração do complexo QRS.	96
Tabela 6.18. Test t para amplitude da onda R.	97
Tabela 6.19. Test t para duração da onda T.....	97
Tabela 6.20. Test t para amplitude da onda T.	97
Tabela 7.1. Descrição das técnicas de estimativa de entropia utilizadas (CHEN <i>et al.</i> , 2009).	100
Tabela 7.2. Entropia para ECG normal.	106
Tabela 7.3. Entropia para IAM anterior.	108

Tabela 7.4. Entropia para IAM inferior.....	110
Tabela 7.5. Média das entropias das derivações - ECG normal.....	112
Tabela 7.6. Média das entropias das derivações - IAM anterior.....	112
Tabela 7.7. Média das entropias das derivações - IAM inferior.....	113
Tabela 7.8. Média e soma das entropias das derivações - ECG normal.....	113
Tabela 7.9. Média e soma das entropias das derivações - IAM anterior.....	113
Tabela 7.10. Média e soma das entropias das derivações - IAM inferior.....	114

LISTA DE ABREVIACÕES

AFM – microscopia de força atômica

AHA – *American Heart Association*

AST – aspartato transaminase

ATP – adenosina trifosfato

AVC – acidente vascular cerebral

BSA – albumina sérica bovina

BRD – bloqueio de ramo direito

CK-MB – creatino-quinase fração MB

DHL – desidrogenase láctica

ECG – eletrocardiograma

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

IAM – infarto agudo do miocárdio

PCR – proteína C reativa

SCA – síndrome coronária aguda

SPR – ressonância de plasma de superfície

TnC – troponina C

TnI – troponina I

TnT – troponina T

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

O eletrocardiograma (ECG) estabeleceu-se como um dos exames complementares de maior capacidade informativa, não invasivo, com baixo custo, facilidade de transporte e manuseio, utilizado no diagnóstico, na avaliação da gravidade e no planejamento terapêutico de cardiopatias.

Para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio (IAM), ainda que o exame clínico e os biomarcadores sejam suficientes para suspeitar ou fazer um diagnóstico, este pode ser confirmado pelo ECG que, além disso, fornece importantes informações sobre a localização e evolução do processo (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; CLIFFORD, 2006).

Do ponto de vista do eletrocardiograma, o infarto agudo apresenta três fases: superaguda, aguda e crônica. O sinal mais precoce de infarto do miocárdio é um aplanamento do segmento ST. Haveria uma perda da discreta concavidade que existe normalmente na ascensão do segmento ST. Isso ocorreria antes do supradesnível e teria duração extremamente transitória (HAHN, CHANDLER, 2006). Instalada a fase superaguda, ocorre supradesnível de ST e aumento na amplitude da onda T. O segmento ST desnivela-se, inicialmente côncavo para cima, com a onda T positiva. A evolução do infarto agudo é observada no traçado por uma inversão da onda T com o aparecimento da onda Q patológica. Está constituída a fase aguda, com a presença de onda Q, o segmento ST agora convexo para cima e a onda T invertida. Após 3 a 6 semanas, o segmento ST já voltou à linha de base e a onda T pode manter-se invertida, com menor amplitude, ou mesmo voltar a ser positiva, como antes. Persiste uma onda Q patológica, marca de que ocorreu um infarto previamente. Por vezes, a onda R será de amplitude diminuída em relação ao traçado antes do infarto. Destaca-se a elevação do segmento ST como a anormalidade mais importante do traçado (CARNEIRO, 1997; TRANCHESI, 1983).

Além das alterações eletrocardiográficas, observa-se a importância da quantificação de marcadores moleculares de lesão miocárdica e marcadores de inflamação. Dentre estes, ressaltam-se a troponina T e a proteína C reativa, as quais serão abordadas nessa pesquisa.

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, a qual é considerada marcador para inflamação e para doenças cardiovasculares. Evidências indicam que a aterosclerose é uma doença inflamatória imune-mediada. O exame de PCR tem alta sensibilidade para predição de risco cardiovascular (RIDKER, 2003).

A troponina T (TnT) é um importante biomarcador de eventos isquêmicos, a qual é utilizada para confirmação do diagnóstico de infarto do miocárdio, juntamente com alterações clínicas e eletrocardiográficas. A troponina destaca-se entre os biomarcadores, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e importância clínica (SINGH, 2010). Ressalta-se que, como critério diagnóstico de IAM, a troponina T permanece elevada durante maior período quando comparada com a troponina I.

Esse trabalho refere-se ao desenvolvimento de biossensores para o diagnóstico molecular de resposta inflamatória sistêmica e doenças cardiovasculares, além da utilização da entropia eletrocardiográfica para o diagnóstico do infarto do miocárdio.

Sendo assim, essa pesquisa tem como objetivo a avaliação clínica de biossensores e as aplicações diagnósticas para detecção e quantificação de troponina T e proteína C reativa. A partir da obtenção dos resultados dos imunossensores e dos testes laboratoriais convencionais, tais como imunoturbidimetria, eletroquimioluminescência, foram obtidas medidas fidedignas por meio de curvas de calibração obtidas com o desenvolvimento dos biossensores. Além disso, o processamento dos sinais eletrocardiográficos e obtenção da entropia destes sinais possibilitam a avaliação de parâmetros do ECG que propiciam otimização do diagnóstico.

A obtenção de sinais eletrofisiológicos e desenvolvimento de imunossensores possibilita a avaliação e acompanhamento da evolução dos pacientes. Sendo assim, há contribuição para a obtenção de um diagnóstico mais rápido, a partir do cálculo da entropia e detecção e quantificação de PCR e TnT, além de melhor prognóstico na síndrome coronária aguda.

CAPÍTULO 2

2 INFARTO AGUDO DO MIOCÁRDIO

2.1 Introdução

O infarto agudo do miocárdio (IAM) constitui-se da necrose miocárdica proveniente da isquemia (ANDERSON, 2005). Consiste na oclusão de uma artéria coronária, ocasionando falta de suprimento sanguíneo para uma área do miocárdio. O miocárdio recebe sangue pelas artérias coronárias e, quando um ramo destas se estreita acentuadamente ou fica obstruído, a região suprida por esse ramo deixa de ter circulação adequada. A área infartada do coração, sem irrigação sanguínea, é eletricamente morta e não pode conduzir impulsos elétricos (Figura 2.1).

O músculo cardíaco contém filamentos de actina e miosina, porém difere do músculo esquelético por ter um ritmo regular constante e ativo durante a sístole e diástole. Além disso, em condições fisiológicas, tem um metabolismo exclusivamente aeróbio, ao contrário do músculo esquelético, que pode funcionar anaerobiamente em curtos períodos. Há mais mitocôndrias no músculo cardíaco, perfazendo quase metade do volume celular. O coração utiliza uma mistura de glicose, ácidos graxos livres e corpos cetônicos, os quais são oxidados pela via do ciclo do ácido cítrico, a fim de liberar a energia requerida para gerar ATP pela fosforilação oxidativa. Os estímulos elétricos para os batimentos ou sístole do miocárdio são iniciados no nodo sinusal quando há liberação de Ca^{2+} livre no citossol; em contrapartida, a diástole ocorre através da recaptação do Ca^{2+} pelo retículo sarcoplasmático, a qual depende de ATP. Já que o coração é aeróbio e obtém praticamente toda sua energia da fosforilação oxidativa, não há suprimento de oxigênio no miocárdio quando há lesões obstrutivas por

depósitos de lipídeos nas artérias coronárias, o que pode ocasionar a necrose de uma parte do miocárdio (NELSON, COX, 2011).

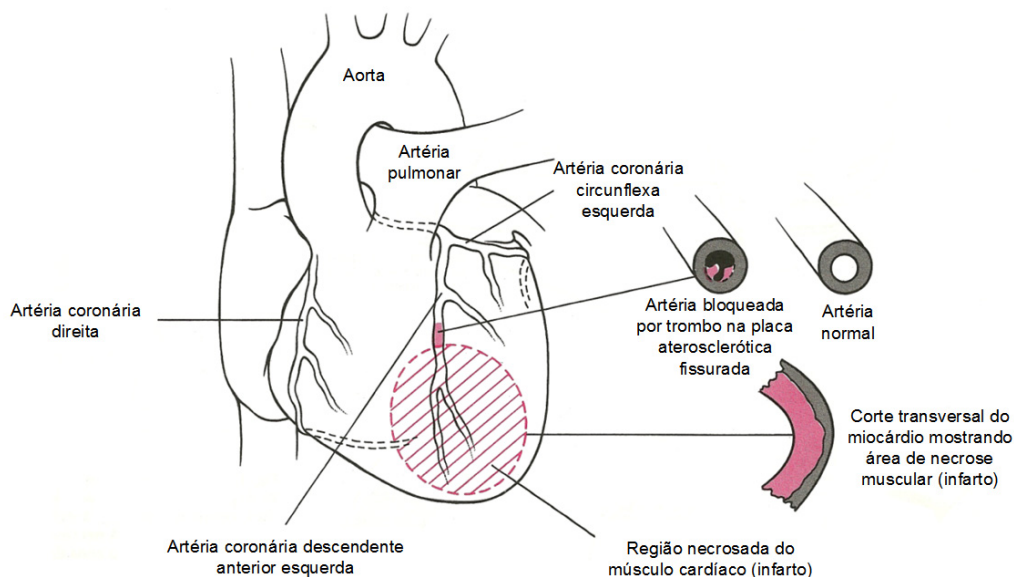


Figura 2.1. Representação esquemática da obstrução aterosclerótica, a alteração aguda na placa, o trombo superposto e a lesão miocárdica no IAM (ROBBINS, 1996).

A aterosclerose consiste no acúmulo de depósito de lipídeos nas artérias, que constituem as placas ateroscleróticas, havendo assim, redução do fluxo sanguíneo. O infarto do miocárdio ocorre quando há obstrução de uma artéria coronária, provocando a isquemia ou necrose da área miocárdica suprida pela artéria ocluída (NELSON, COX, 2011).

Na fase inicial do IAM, há dilatação progressiva dos vasos sanguíneos, além do aporte de circulação colateral na área infartada. As fibras musculares utilizam o restante de oxigênio no sangue, ocorre assim, redução da hemoglobina. Assim, a área infartada fica com um tom azulado e os vasos sanguíneos parecem estar ingurgitados, pois houve redução do fluxo sanguíneo. Posteriormente, as paredes vasculares tornam-se muito permeáveis e o miocárdio fica edemaciado, devido à redução do metabolismo celular. Após poucas horas as células musculares morrem, com quase nenhum suprimento sanguíneo (GUYTON, HALL, 2011).

2.2 Alterações eletrocardiográficas

2.2.1 Isquemia

A isquemia provoca deficiência de oxigênio em relação à demanda de oxigênio do miócito, ocasionando disfunção miocárdica sem dano permanente. Compromete vários fatores que são responsáveis ou desempenham alguma função na geração do potencial transmembrana. As repercussões no ECG variam muito e dependem de quatro fatores cruciais: duração, extensão, topografia e existência pregressa de alterações no ECG (PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006).

A duração da isquemia é um fator decisivo na magnitude das alterações anatomopatológicas no miocárdio e, conseqüentemente, no ECG, apresentando a seguinte sequência:

- < 2 minutos: isquemia miocárdica sem atordoamento miocárdico;
- 2-20 minutos: isquemia miocárdica com atordoamento miocárdico;
- > 20 minutos: infarto do miocárdio.

Quanto à extensão, a isquemia pode envolver toda a parede miocárdica (transmural) ou não. Em relação à topografia, a isquemia pode comprometer diferentes regiões do miocárdio, como por exemplo, anterior, inferior, entre outras (ELHENDY *et al.*, 1995; HORACEK *et al.*, 2006).

As modificações mais precoces no ECG provocadas pela isquemia (inferior a dois minutos) envolvem a forma, amplitude e polaridade da onda T.

É oportuno lembrar que a onda T normal tem forma assimétrica, ou seja, o ramo ascendente tem contorno mais arrastado e menos íngreme que o ramo descendente, e o pico é relativamente arredondado. Na vigência de isquemia, a onda T passa a ter forma mais simétrica, mais estreita e pico pontiagudo. Para essa forma também contribui a retificação do segmento ST, isto é, o registro mais isoeletrico desse segmento, ou mesmo o seu desaparecimento sendo englobado pela onda T. Ocorre aumento da amplitude da onda T, independentemente se positiva ou negativa (ACHAR, KUNDU, NORCROSS, 2005; CARNEIRO, 1997).

2.2.2 Lesão

A lesão significa a progressão do comprometimento isquêmico do miocárdio, ou seja, o agravamento da insuficiência coronariana aguda, manifestando-se pela modificação do contorno e pelo supra ou infradesnível do segmento ST. Há alteração da permeabilidade da membrana celular, promovendo a perda de vários elementos como o sódio, o cálcio, o magnésio e, em especial, o potássio, além de retardar o influxo deste último íon em grau mais acentuado que o causado pela isquemia. Na área afetada observam-se as seguintes alterações (PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006):

- O potencial de repouso aumenta de - 90 mV a - 65 mV;
- A voltagem e a duração da onda monofásica do potencial de ação diminuem significativamente;
- A velocidade de condução do estímulo torna-se muito lenta (sístole elétrica lenta).

O desnível ou desnivelamento do segmento ST dirige-se para a superfície onde há lesão. Assim, a lesão subepicárdica manifesta-se pelo supradesnivelamento desse segmento nas derivações orientadas para a superfície epicárdica lesada, e por infradesnivelamento nas derivações orientadas para a superfície endocárdica sem lesão. Em contrapartida, a lesão subendocárdica manifesta-se pelo infradesnível do segmento ST nas derivações orientadas para a superfície epicárdica sem lesão, e por supradesnível desse segmento nas derivações orientadas para a superfície endocárdica lesada (ANDERSEN *et al.*, 2010; CARNEIRO, 1997).

2.2.3 Necrose

Na vigência de necrose, o miócito não pode ser mais ativado. No ECG manifesta-se por diferentes alterações eletrocardiográficas decorrentes da diminuição da deflexão positiva do complexo QRS nas derivações voltadas para a área necrótica. Assim, é possível obter diferentes padrões eletrocardiográficos sugestivos de necrose, apresentados a seguir:

- 1) Complexo QRS: registrado nas derivações voltadas para a área necrótica e constituído por onda Q patológica, seguida de ondas R. Além disso, a onda Q patológica tem duração ≥ 40 ms (1mm) ou um terço da altura do complexo QRS.
- 2) Sequência anormal da magnitude das ondas Q normais ou a ausência destas, registradas nas derivações precordiais voltadas para o ventrículo esquerdo (V4-V6), que normalmente registra-se através de ondas Q progressivamente mais profundas. A ausência desse aprofundamento progressivo, ou seja, onda Q em V4 mais profunda que em V6 ou a ausência das ondas Q podem sugerir a existência de infarto transmural no terço inferior do septo interventricular.
- 3) Perda da deflexão positiva em derivações que se iniciam dessa forma: registrada principalmente nas derivações precordiais V1 e V2, na vigência de necrose miocárdica da porção média do septo interventricular. O complexo RS normalmente registrado nessas derivações é substituído por complexo QS ou por complexo RS com redução progressiva da amplitude, habitualmente referido como baixa progressão da onda R (V1-V3). Isto também pode ocorrer na derivação V4, voltando a registrar amplitude mais ampla em V5 ou V6 e nesta situação suspeita-se de necrose subepicárdica do terço inferior do septo interventricular.
- 4) Ondas R amplas em derivações precordiais direitas: podem refletir a necrose miocárdica da parede posterior, decorrente da perda das forças elétricas dessa área. Representam a imagem em espelho dos complexos QS registrados pelas derivações voltadas para a parede posterior do ventrículo esquerdo e a maior magnitude das forças elétricas da parede anterior, sem a oposição das forças elétricas da parede posterior necrosada.
- 5) Diminuição da amplitude da onda R: registrada em derivações com onda R dominante, por exemplo, o complexo QR das derivações laterais esquerdas (D1, aVL, V5 e V6).

2.3 Fisiopatologia

A isquemia cardíaca é decorrente de alterações nas artérias coronárias, com redução do fluxo sanguíneo. Denomina-se também como doença arterial coronária ou cardiopatia isquêmica.

Entretanto, quando se examina o miocárdio, deve-se observar que o real problema surge na parede do vaso, nas interações entre o endotélio e alguns elementos sanguíneos como as plaquetas e macrófagos, os quais são fundamentais na fisiopatologia da isquemia cardíaca.

As sequelas imediatas da oclusão coronária são: a perda inicial de contratilidade e arritmias, e a morte subsequente das células miocárdicas isquêmicas, que caracterizam um infarto agudo do miocárdio.

Existem dois efeitos imediatos prejudiciais da isquemia miocárdica: perda da função contrátil e arritmias potencialmente letais. A principal consequência da isquemia prolongada é a morte celular. Embora o início da falência cardíaca e arritmias agudas possuam a mesma origem, os processos fisiopatológicos envolvidos em cada uma são diferentes, pois a interrupção do fluxo coronário produz ações especiais na excitação-contração e na origem e propagação da onda de despolarização que ativa o coração (KATZ, 1992).

2.3.1 Eletrofisiologia

2.3.1.1 Corrente de lesão

A corrente de lesão está entre os mecanismos que causam arritmias de origem isquêmica. O surgimento da lesão ocorre no período de repouso em células isquêmicas do miocárdio, está, portanto, associada à condução lenta, e dá origem às diferenças de potencial que participam na patogênese de algumas arritmias. Correntes de lesão também dão origem a importantes características diagnósticas no eletrocardiograma de pacientes com diferentes tipos de obstrução das artérias coronárias.

A principal causa para a despolarização do coração isquêmico é a rápida perda de potássio. A perda de K^+ de uma célula despolariza o miocárdio em repouso, o efeito da despolarização é amplificado quando esse cátion não pode ser levado para fora do espaço extracelular por ausência de perfusão em torno das células isquêmicas. As correntes de lesão, que fluem entre regiões normais e isquêmicas do coração em repouso, não apenas dão origem

a arritmias, mas também propiciam diagnósticos importantes com desvios do segmento ST no ECG de pacientes com isquemia miocárdica.

2.3.1.2 Segmento ST

Em relação aos mecanismos de deslocamento do segmento ST através das correntes de lesão, é importante salientar que o potencial zero será considerado inscrito durante o segmento TP.

Elevação do segmento ST na isquemia transmural

Os segmentos ST elevados representam uma região de lesão transmural, pois a corrente de lesão estabelecida pelas células despolarizadas significa que um eletrodo que registra a atividade da região isquêmica está em uma área de repouso (eletronegativa). Esta corrente elétrica diastólica causa uma depressão no segmento TP, que foi assumido como linha de base do ECG (Figura 2.2 A). A magnitude desta queda de diferença de potencial durante a sístole, quando o coração fica despolarizado, eleva o segmento ST em relação ao segmento TP. Como o segmento TP é assumido para gravar uma diferença de potencial zero durante a diástole, a eletronegatividade diminuída durante a sístole é interpretada como elevação do segmento ST (Figura 2.2 A).

Outras explicações para a elevação do segmento ST na isquemia aguda incluem diferenças de potencial que surgem durante as fases posteriores da sístole, devido à abreviação do potencial de ação na área isquêmica. Outra justificativa é baseada em um retardo na condução da corrente de despolarização, que é propagada lentamente através da área isquêmica, gerando uma onda de despolarização que inscreve elevação do segmento ST quando se aproxima do eletrodo (KATZ, 1992).

Depressão do segmento ST na isquemia subendocárdica

Ao contrário da isquemia transmural descrita anteriormente, a qual provoca elevação ou supradesnívelamento do segmento ST, a isquemia subendocárdica causa uma mudança exatamente oposta no segmento ST. A isquemia subendocárdica é comum porque a “inanição de energia” desenvolve mais rapidamente nesta camada do ventrículo esquerdo, onde demandas de energia são altas e o fornecimento de sangue é precário. Na verdade, a isquemia subendocárdica e a depressão do segmento ST são muitas vezes vistas na hipertrofia ventricular

esquerda, mesmo quando as artérias coronárias estão normais, pois o subendocárdio é sensível à isquemia. O infradesnívelamento do segmento ST desenvolve-se na isquemia subendocárdica, sendo registrado a partir de um eletrodo colocado na superfície do corpo, o qual detecta uma área de positividade crescente durante a diástole. Como resultado, o segmento TP é elevado, o que é lido como depressão do segmento ST (Figura 2.2 B).

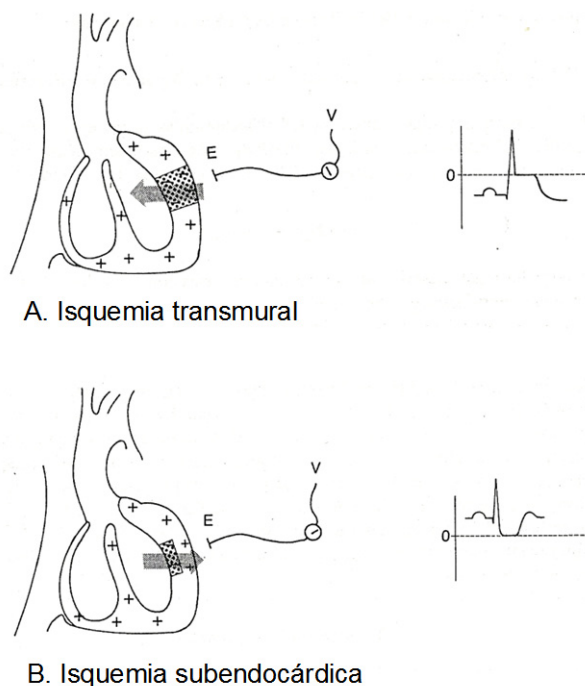


Figura 2.2. Efeitos da corrente de lesão causadas por isquemia transmural (A) e subendocárdica (B) (KATZ, 1992).

A isquemia caracteriza-se por um desequilíbrio entre a demanda e o suprimento de oxigênio do miocárdio. Existem, portanto dois tipos de isquemia:

- **Isquemia de suprimento**, na qual há redução do fluxo sanguíneo e do suprimento de oxigênio, ocorrendo agregação plaquetária ou a formação de trombos. Este tipo de isquemia é responsável pela ocorrência de infarto do miocárdio e pela maioria dos episódios de angina instável. Pode ocorrer elevação do segmento ST, se a obstrução total do vaso é devido a uma trombose em um paciente com IAM ou a um espasmo arterial coronário na angina vasoespástica. Caso a obstrução não seja removida, por trombólise ou um vasodilatador arterial coronariano, a isquemia persiste e acaba por levar à necrose;

- **Isquemia de demanda**, na qual ocorre aumento do fluxo sanguíneo coronário, que é insuficiente para suprir o aumento da demanda de oxigênio no miocárdio. A demanda é aumentada durante períodos de taquicardia em indivíduos com obstrução coronária crônica parcial. É responsável por episódios de angina estável crônica. O início desta isquemia é na região subendocárdica do ventrículo esquerdo e assim pode provocar infradesnívelamento do segmento ST (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; KATZ, 1992).

2.3.1.3 Ondas Q patológicas e necrose

A representação eletrocardiográfica para necrose ventricular é a presença de onda Q patológica (Figura 2.3).

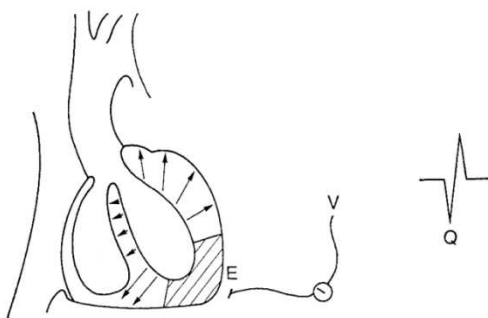


Figura 2.3. Onda Q registrada durante a propagação da onda de despolarização numa região de necrose transmural (KATZ, 1992).

A gênese da onda Q patológica ocorre, pois o miocárdio necrótico não pode gerar uma onda de despolarização, porém ainda pode conduzir eletricidade, permitindo assim que o eletrodo capte o sinal através do músculo morto dentro da cavidade do VE. Tal fato pode ser observado através da colocação de um eletrodo na cavidade ventricular esquerda, havendo assim, o registro apenas do complexo QS, pois a despolarização do VE inicia-se no endocárdio, que faz com que todos os vetores retrocedam de sua cavidade.

As ondas Q patológicas são vistas em outras condições, por exemplo, quando o miocárdio viável foi substituído por tecido cicatricial, como em um aneurisma ventricular, ou quando um tumor invade a parede do ventrículo.

O epicárdio viável pode produzir uma pequena onda de despolarização que gera uma onda R. Isto também levou à distinção clínica entre infarto com onda Q e sem onda Q. Assim, o prognóstico imediato de um infarto sem onda Q é melhor que um infarto com onda Q, no entanto, o prognóstico de 6 a 12 meses é quase o mesmo, principalmente porque o curso em

longo prazo do paciente com cardiopatia isquêmica é determinado principalmente pela progressão da doença arterial coronariana e da perda miocárdica progressiva (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; KATZ, 1992).

2.3.2 Morte celular na cardiopatia isquêmica

A morte celular miocárdica (necrose) começa após 15 a 40 minutos de isquemia total em animais experimentais, e após cerca de 6 horas, poucas células viáveis permanecem. A necrose começa no endocárdio, onde as necessidades energéticas são maiores, e se espalha para fora através da parede do VE em direção ao epicárdio. No entanto, pode haver diferença de acordo com cada paciente por várias razões. Primeiramente, existem mudanças dinâmicas do processo oclusivo na artéria coronária, relacionadas à deposição de plaquetas e formação de trombos que podem sofrer lise espontânea (KATZ, 1992).

Além disso, muitos indivíduos com doença cardíaca isquêmica, principalmente os idosos com infarto prévio do miocárdio, desenvolvem uma extensa circulação colateral, de modo que a oclusão de um vaso pode diminuir ao invés de deter o fluxo de sangue arterial para uma determinada região do ventrículo esquerdo (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; KATZ, 1992).

Células miocárdicas isquêmicas podem necrosar, dependendo do tempo decorrido desde a obstrução até a reperfusão. Regiões do miocárdio que não foram reperfundidas desenvolvem um infarto pálido e acelular, que por vezes tem sido chamado de mumificação. Como os leucócitos não podem ter acesso ao tecido necrótico em uma área perfundida por uma artéria coronária obstruída, ocorre autólise das células do miocárdio neste tipo de infarto. Um processo mais intenso ocorre quando as células danificadas e irreversivelmente isquêmicas são reperfundidas. Sob estas condições, a entrada descontrolada de cálcio provoca o rompimento das células, provavelmente devido ao dano da membrana e à troca de sódio / cálcio. A restauração do fluxo sanguíneo, portanto, pode levar a um infarto hemorrágico no qual as células inflamatórias, com todos os seus produtos catabólicos (lipases, proteases, radicais livres), destroem as células miocárdicas necrosadas. No entanto, parece que o remodelamento é melhorado por reperfusão, que permite menor dilatação do VE, reduz a tensão da parede e poupa energia (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; KATZ, 1992).

No IAM, as células acidófilas, coaguladas e anucleadas podem persistir por semanas. Posteriormente, as células miocárdicas necróticas são removidas por fragmentação e fagocitose

dos restos celulares por leucócitos removedores e pela ação das enzimas lisossômicas proteolíticas trazidas pelos leucócitos imigrantes (NELSON, COX, 2011).

A área necrótica funciona como estímulo inflamatório, causando vasodilatação nos tecidos vizinhos. Uma consequência benéfica é que isto facilita a chegada de células fagocitárias, que participam da eliminação do produto necrótico (KATZ, 1992; NELSON, COX, 2011).

As células musculares cardíacas sofrem necrose de coagulação, apresentando-se acidófilas, anucleadas e com preservação da forma básica do tecido. Pode-se observar a presença de células inflamatórias no espaço intersticial (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003).

2.4 Patogênese

O termo infarto agudo do miocárdio significa, basicamente, a morte de cardiomiócitos causada por isquemia prolongada e súbita. Em geral, esta isquemia é causada por trombose e/ou vasoespasmos sobre uma placa aterosclerótica. O processo migra do subendocárdio para o subepicárdio (RAITT, MAYNARD, WAGNER, 2008). A maior parte dos eventos é causada por ruptura súbita e formação de trombo sobre placas vulneráveis, inflamadas, ricas em lipídios e com capa fibrosa delgada. Uma porção menor está associada à erosão lenta da placa aterosclerótica. Existe um padrão dinâmico de trombose e trombólise simultaneamente associadas à vasoespasmos, o que pode causar obstrução intermitente do fluxo e embolização distal (um dos mecanismos responsáveis pela falência da reperfusão tecidual apesar da obtenção de fluxo na artéria acometida).

Dentro de um espectro de possibilidades relacionadas com o tempo de evolução, o miocárdio é progressivamente acometido, com representação através das áreas de isquemia, lesão e necrose. Na primeira, predominam distúrbios eletrolíticos, na segunda, alterações morfológicas reversíveis e na última, danos definitivos. Da mesma forma, essas etapas se correlacionam com a diversidade de apresentações clínicas que variam da angina instável e infarto sem elevação do segmento ST até o infarto com esse supradesnível (SCHOEN, 2005). É por isso que o manejo do infarto é baseado no rápido diagnóstico, na desobstrução imediata da artéria coronária comprometida, manutenção do fluxo e reversão de complicações potencialmente fatais (arritmias, falência cardíaca e distúrbios mecânicos).

2.5 Etiopatogenia

O infarto do miocárdio está frequentemente associado a uma causa mecânica, isto é, 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 lesada, tempo de evolução da obstrução e desenvolvimento de circulação colateral, que quando bastante extensa, é capaz de impedir a instalação de infarto, mesmo em casos de obstrução total da coronária (HAHN, CHANDLER, 2006; SCHOEN, 2005).

Os pacientes acometidos por infarto são geralmente do sexo masculino. Acredita-se que as mulheres tenham um efeito protetor devido à produção de hormônio (estrógeno), sendo que, após a menopausa, devido à falta de produção desse hormônio, a incidência de infarto nestas aumenta consideravelmente (ACHAR, KUNDU, NORCROSS, 2005).

Existem vários fatores associados ao maior risco para ocorrência do infarto do miocárdio. Destaca-se, entre estes, a idade, pois a incidência aumenta após os 50 anos. Outro fator que influencia o IAM é a taxa de colesterol no sangue. Quanto mais elevada a quantidade de colesterol no sangue, maior a incidência de infarto. Há lipoproteínas carreadoras do colesterol, a de baixa densidade (LDL), a de densidade muito baixa (VLDL) e a de alta densidade (HDL). Esta última parece ter um efeito protetor para a artéria, sendo ideal mantê-lo em níveis altos no sangue. Já a LDL, aumenta a chance de infartos quando presente em níveis elevados (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003).

Muitas vezes, o indivíduo possui colesterol elevado devido a doenças hereditárias, como a hipercolesterolemia familiar. Nesta situação, pessoas mais jovens podem apresentar infarto do miocárdio. É importante detectar estes casos na família, pois quando há tratamento precoce, é possível desenvolver hábitos de vida que minimizem o desenvolvimento do infarto (JULIAN, COWAN, 1996; NIELSEN, 1973; SCHOEN, 2005).

O diabetes também é apontado como uma doença que aumenta o risco de infarto do miocárdio. Como tem caráter hereditário, novamente é importante saber se há casos na família, para detecção precoce da doença. A hipertensão arterial também aumenta o risco de infarto do miocárdio, assim como a obesidade (ANDERSON, 2005).

O tabagismo está diretamente relacionado ao infarto do miocárdio, sendo que os fumantes são 60% mais propensos ao IAM que os não-fumantes. O fumo causa não apenas a lesão de vasos do coração, como também aumenta a possibilidade de formação de coágulos

(trombose). Esta tendência à formação de coágulos aumenta sensivelmente com o uso de pílulas anticoncepcionais, principalmente em mulheres entre os 30 e 40 anos de idade (JULIAN, COWAN, 1996).

A inatividade física e o estresse também desempenham papel importante no desenvolvimento do infarto (NIELSEN, 1973).

2.6 Evolução eletrocardiográfica

Do ponto de vista do eletrocardiograma, o infarto apresenta três fases: superaguda, aguda e crônica (CARNEIRO, 1997).

O sinal mais precoce de infarto agudo do miocárdio é uma retificação do segmento ST, em que há perda da discreta concavidade existente normalmente na ascensão deste segmento. Isso ocorre antes de se manifestar o supradesnível e tem duração extremamente transitória (HAHN, CHANDLER, 2006).

Instalada a fase superaguda, é regra habitual a presença do bloqueio de lesão, que se associa ao supradesnível de ST e aumento na amplitude da onda T. O segmento ST desnivela-se, sendo inicialmente côncavo para cima, com a onda T positiva. Essa fase inicial é muito semelhante à encontrada na pericardite. Representa, por outro lado, o pior momento da evolução, pela maior possibilidade de ocorrer fibrilação ventricular. A duração desta fase é de horas ou no máximo 1 a 2 dias, raramente persistindo por dias ou semanas (CARNEIRO, 1997).

A evolução do infarto é observada no traçado por uma inversão da onda T com o aparecimento da onda Q patológica. Está assim constituída a fase aguda, com a presença de onda Q, o segmento ST, agora convexo para cima, e a onda T invertida.

Após 3 a 6 semanas, o segmento ST já voltou à linha de base e a onda T pode manter-se invertida, com menor amplitude, ou mesmo voltar a ser positiva como antes. Tardiamente, persiste uma onda Q patológica, sinal de que ocorreu um infarto prévio. Por vezes, a onda R será de amplitude diminuída em relação ao traçado antes do infarto.

A onda Q de um infarto documentado pode desaparecer em uma pequena porcentagem de casos, geralmente dentro dos primeiros dois anos após o evento. Caso o desaparecimento ocorra em torno de 6 ou 7 dias, sem caracterização enzimática, é improvável que tenha havido infarto.

Por outro lado, são comuns, nos traçados pós-infarto, manifestações de insuficiência coronariana crônica (pequenos infradesnívelamentos do segmento ST e alterações primárias da

onda T). Quando o segmento ST se mantém supradesnívelado por um período igual ou superior a quinze dias, deve ser investigada a possível existência de um aneurisma ventricular, mais comumente associado ao infarto da parede anterior (PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006).

A elevação do segmento ST constitui a alteração do traçado mais importante para indicar a presença de lesão miocárdica (CARNEIRO, 1997; TRANCHESI, 1983).

2.7 Localização eletrocardiográfica

As derivações eletrocardiográficas demonstram alterações referentes ao processo isquêmico e através destas, torna-se possível estabelecer critérios para a localização do infarto. A localização é constatada por meio das derivações identificadas pela presença de ondas Q patológicas e de mudanças no segmento ST, para cada região do miocárdio acometida por IAM, como descrito na Tabela 2.1. A distinção mais importante é entre os infartos anterior e inferior, os quais diferem clinicamente e em relação aos escores de prognóstico.

Tabela 2.1. Localização eletrocardiográfica do IAM (KATZ, 1992).

Localização	Derivações acometidas
Anterior	
Anteroseptal	V1, V2
Anterior	V2, V3, V4
Anterolateral	DI, aVL, V4, V5, V6
Anterior extenso	DI, aVL, V1-V6
Inferoposterior	
Inferior	DII, DIII, aVF
Posterior	V1
Inferolateral	DII, DIII, aVF, V5, V6
Posterolateral	V1, V5, V6
Inferoposterior	V1, DII, DIII, aVF

2.8 Diagnóstico

O diagnóstico é feito com base no quadro clínico, nas alterações eletrocardiográficas e nos resultados dos exames laboratoriais. Tendo em vista que os sintomas são extremamente variados e que a elevação dos biomarcadores inicia-se cerca de seis horas após o início da dor, o principal instrumento diagnóstico e determinante da conduta é o eletrocardiograma, o qual poderá apresentar supradesnívelamento do segmento ST (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; SCHWEITZER, 1990).

2.8.1 Exame clínico

O sintoma mais frequente do IAM é a precordialgia, de início súbito, intensa, constritiva, possui duração prolongada (mais de 30 minutos a algumas horas de duração) e não é aliviada com repouso ou nitroglicerina.

A dor pode irradiar-se para o membro superior esquerdo; a irradiação para mandíbula, dorso e epigástrico também é possível (BRIEGER *et al.*, 2004; RUDE *et al.*, 1983).

A dor pode vir acompanhada de aumento da frequência respiratória, palidez, sudorese e confusão mental. Pode haver, por reflexo vagal, náuseas e vômitos (BRIEGER *et al.*, 2004).

2.8.2 Alterações eletrocardiográficas

O eletrocardiograma é o exame mais utilizado no diagnóstico do IAM. Deve ser feito seriadamente nas primeiras 24 horas e diariamente após o primeiro dia. O supradesnívelamento do segmento ST maior que 1 mm em duas derivações contíguas determina o diagnóstico e correlaciona-se com a topografia do infarto. Por exemplo: elevação do segmento ST em V1, V2, V3 relaciona-se com parede septal; D1 e aVL com parede lateral alta; V1 a V6, anterior extensa; D2, D3 e aVF com parede inferior e finalmente V7 e V8 com parede posterior (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003).

A evolução do IAM pode ser observada no traçado eletrocardiográfico através do aparecimento da onda Q patológica. Além disso, é possível inferir a artéria comprometida pelo eletrocardiograma (NIELSEN, 1973).

No infarto inferior, se o supradesnívelamento do segmento ST em D3 for maior que em D2 e houver infradesnívelamento em D1 e aVL maior do que 1 mm, há grande possibilidade de lesão da artéria coronária direita. A associação com elevação do segmento ST de V4 favorece o envolvimento do ventrículo direito. Se isso não estiver presente, mas houver supradesnível em D1, aVL, V5, V6 e infra em V1, V2 e V3, provavelmente a artéria envolvida é a circunflexa (CARNEIRO, 1997; HORACEK *et al.*, 2006).

No infarto anterior com supradesnívelamento do segmento ST em V1, V2 e V3, se a elevação for maior do que 2,5 mm em V1 ou se houver bloqueio de ramo direito (BRD) agudo, ou ainda se houver infra associado em D2, D3 e aVF, a maior probabilidade é de uma lesão proximal da artéria descendente anterior. Por outro lado, se na mesma situação houver

supradesnível associado em D2, D3 e aVF, a probabilidade maior é de lesão na porção distal da artéria descendente anterior (CARNEIRO, 1997; JULIAN, COWAN, 1996).

Infartos da parede posterior podem manifestar-se com infra em V1, V2 e V3. Nesses casos, deve-se observar as derivações V7 e V8, que evidenciam supradesnívelamento e, portanto, serão suficientes para indicar a reperfusão (PALMERI *et al.*, 1982).

2.8.3 Biomarcadores

A realização de testes para dosagem de biomoléculas no plasma pode oferecer informações relevantes sobre a severidade e estágio da lesão cardíaca. Esta lesão faz com que haja liberação das células cardíacas necrosadas para a corrente sanguínea, através da membrana sarcolemal comprometida. Os exames laboratoriais utilizados para diagnosticar um IAM incluem a dosagem de creatinoquinase (CK) e suas isoenzimas, além da análise da troponina e da mioglobina (CARNEIRO, 1997; PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006).

A principal consequência bioquímica inicial da isquemia do miocárdio consiste na cessação de glicólise aeróbica e, consequentemente, no estabelecimento da glicólise anaeróbica dentro de poucos segundos. Isto acarreta uma produção inadequada de fosfatos de alta energia (p. ex., creatina fosfato e adenosina trifosfato [ATP]) e o acúmulo de ácido láctico, o que resulta na diminuição do pH celular e alterações metabólicas importantes. Sem energia para a manutenção da sua atividade metabólica normal e integridade da membrana celular, a célula morre por necrose, liberando macromoléculas (biomarcadores) na circulação.

Uma vez que exista a suspeita clínica de IAM, os seguintes exames podem ser realizados para confirmar essa situação (ANDERSON, 2005): medidas das concentrações séricas de biomarcadores relacionados ao metabolismo do miocárdio, tais como troponinas T e I, creatinoquinase (Cktotal) e sua isoenzima MB (CK-MB), desidrogenase láctica (DHL), mioglobina e aspartato transaminase (AST).

Alguns destes marcadores possuem valor diagnóstico limitado, pois a sua presença em outras estruturas não cardíacas pode resultar em elevações plasmáticas na ausência de um dano miocárdico, havendo baixa especificidade de dano miocárdico.

Destaca-se ainda, a quantificação de proteína C reativa para acompanhamento da evolução dos pacientes acometidos por IAM, já que há associação desta com o risco de eventos cardiovasculares.

A creatinoquinase (CK) com sua isoenzima MB (CK-MB) é um bom indicador para o diagnóstico de infarto do miocárdio. O nível de CK-MB começa a elevar de 3 a 6 horas após o início do IAM, atinge valor máximo em torno de 12 a 24 horas e retorna ao normal em 24 a 48 horas (RAVEL, 1997). Possui sensibilidade e especificidade maior que 97% nas primeiras 48 horas. Porém não apresenta alta sensibilidade nos estágios iniciais do IAM, devido ao fato de não apresentar elevação sérica até a quarta hora após o início da precordialgia (WALLACH, 2003). Os valores normais são menores que 25 U/l (NELSON, COX, 2011).

Não é necessária para a indicação de reperfusão imediata, já que inicia sua elevação após algumas horas do início dos sintomas. A curva detectada pela coleta seriada (a cada 6 horas, por exemplo) mostra ascenso e descenso do marcador. O pico costuma ocorrer nas primeiras 24 horas e correlaciona-se com a extensão do infarto (RAVEL, 1997; WALLACH, 2003).

A CK-MB eleva-se quando ocorre isquemia e necrose em uma região do miocárdio. No IAM os valores de CK-MB podem ser superiores a 50 U/l. A interpretação dos resultados pode ser a seguinte:

A. Valores de CK-MB acima de 50 U/l, mas inferiores a 4% do valor do CPK total, podem sugerir lesão de músculo esquelético;

B. CK-MB acima de 25% do valor do CPK total pode indicar presença de isoenzima, neste caso o indicado é dosar o CK-MB por meio de metodologias alternativas, como a quimioluminescência. A concentração plasmática de CK-MB é elevada em aproximadamente 10 a 40% das miocardites. Os danos no miocárdio originam a liberação transitória de CK-MB para a circulação. Esse aumento de CK-MB atinge o auge entre 12 e 24 horas, depois regressa ao normal dentro de 48 a 72 horas (WALLACH, 2003).

Devido à maior especificidade da troponina para diagnóstico de infarto do miocárdio e à ampla utilização de proteína C reativa para avaliar a evolução de pacientes com doenças cardiovasculares, estes foram os marcadores abordados nesta pesquisa, os quais serão detalhados a seguir.

2.8.3.1 Troponina

A troponina é uma proteína encontrada no miocárdio e participa do processo contrátil. Alterações significativas da troponina plasmática são detectadas em pacientes com lesão miocárdica (angina instável ou infarto do miocárdio).

No processo contrátil dos sarcomêros há filamentos grossos e finos. O disco Z é formado por três proteínas, alfa actinina, tropomiosina e actina. A estrutura filamentosa da linha Z é formada pela associação entre actina e tropomiosina. Os filamentos grossos são formados pela associação de moléculas de miosina. Já os filamentos finos são compostos por três proteínas: actina, tropomiosina e troponina (AIRES, 1999).

Actina e miosina são proteínas contráteis, enquanto a troponina e a tropomiosina são proteínas moduladoras da contração. A actina possui sítios ativos que interagem com a miosina, sendo assim, há ativação da ATPase miosínica, hidrólise de ATP e liberação de energia para que a contração ocorra (GUYTON, HALL, 2011). Durante o repouso, há bloqueio desse sítio pela tropomiosina e ligação desta à troponina.

A Figura 2.4 apresenta a interação entre actina, tropomiosina e troponinas.

A troponina é formada por três subunidades:

Subunidade I: a troponina I (TnI) inibe o sítio ativo da actina a partir da interação com a tropomiosina;

Subunidade C: a troponina C (TnC) tem muita afinidade pelo íon Ca^{2+} ;

Subunidade T: a troponina T (TnT) liga-se à tropomiosina mediante a interação do Ca^{2+} com a troponina.

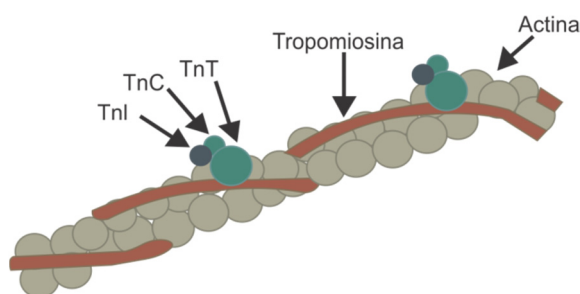


Figura 2.4. Representação esquemática de proteínas envolvidas na contração muscular - actina, tropomiosina e troponinas I, C e T.

A partir da interação do Ca^{2+} com a troponina, a tropomiosina se desloca, há liberação dos sítios ativos da actina e ocorre a interação actina-miosina.

Há estrita relação entre a atividade enzimática das proteínas contráteis e a função miocárdica, principalmente relacionada às alterações cardíacas. Observa-se atividade reduzida da ATPase da miosina em condições de insuficiência cardíaca (AIRES, 1999).

Os biomarcadores séricos cardíacos são macromoléculas intracelulares liberadas após morte e perda da integridade da membrana dos miócitos, que se difundem pelo interstício do miocárdio e posteriormente atingem a circulação (NELSON, COX, 2011).

As sequelas imediatas da oclusão coronária são: perda inicial de contratilidade, arritmias e morte subsequente das células miocárdicas (GUYTON, HALL, 2011).

No infarto, o dano tecidual ocasiona o extravasamento de enzimas intracelulares para o sangue, as quais são utilizadas no diagnóstico da síndrome coronariana isquêmica (NICOLAU *et al.*, 2014).

Aproximadamente 3 a 8% da troponina encontra-se livre no sarcoplasma dos cardiomiócitos, mas a grande porcentagem está incorporada nos miofilamentos finos. Após lesão miocárdica, a troponina é detectada na corrente sanguínea (COLLINSON *et al.*, 2001).

A troponina C é distribuída nas fibras musculares de contração lenta e não é considerada um biomarcador específico cardíaco, pois os genes que codificam as isoformas cardíaca e esquelética da TnC são idênticos, sendo assim, não há diferenciação estrutural entre as isoformas. Portanto, a TnC não é utilizada em testes diagnósticos de lesão miocárdica.

Em contrapartida, as troponinas T e I possuem diferentes isoformas no músculo cardíaco e esquelético, codificadas por genes separados e, conseqüentemente, têm diferentes sequências de aminoácidos. As respectivas isoformas cardíacas de TnT e TnI são específicas para o miocárdio.

As isoformas da troponina T e da troponina I são distintas, desta forma há imunoensaios para quantificá-las e utilizá-las no diagnóstico de infarto do miocárdio (SINGH *et al.*, 2010).

A estrutura tridimensional da troponina T humana está representada na Figura 2.5.

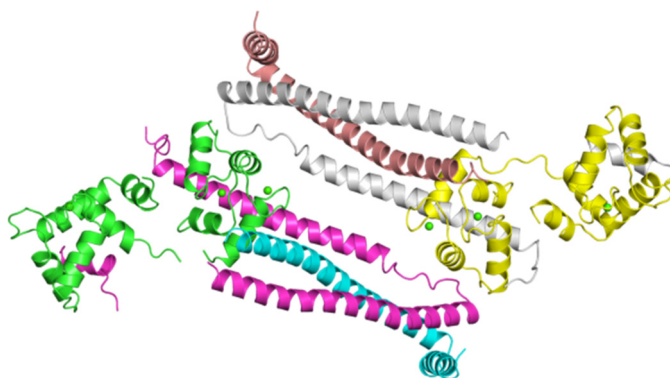


Figura 2.5. Estrutura tridimensional da troponina T humana (Protein Data Bank in Europe, 2014).

O diagnóstico do infarto é realizado com base nas alterações clínicas, principalmente precordialgia, alterações eletrocardiográficas, relacionadas às alterações no segmento ST e onda T ou ondas Q proeminentes, além dos marcadores bioquímicos de lesão miocárdica (BRAUNWALD *et al.*, 2003; LEWANDROWSKI, 2014; VASATOVA *et al.*, 2013).

A troponina destaca-se entre os biomarcadores devido à alta sensibilidade, especificidade e importância clínica (SINGH, 2010).

A troponina pode ser quantificada por meio de imunoensaio por eletroquimioluminescência. Neste método, os compostos marcados com rutênio e biotina e as micropartículas paramagnéticas são ligadas ao analito. A reação é transferida para a célula de medição, um ímã é usado para fixar as micropartículas paramagnéticas na superfície do eletrodo que gera um sinal elétrico, este sinal é utilizado para iniciar a reação entre rutênio e tripropilamina. A reação gera luz que é emitida em um sinal contínuo e rápido. O sinal é proporcional à concentração de analito a ser quantificado na amostra (SOARES *et al.*, 2012).

O teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) para as troponinas miocárdicas é utilizado para o auxílio diagnóstico e para análise do prognóstico do infarto do miocárdio. Imunoensaios dependem da presença de isoformas das subunidades das troponinas. Há aumento significativo das concentrações de troponina T (TnT) no plasma poucas horas após o início da precordialgia, com um pico de até 300 vezes os valores plasmáticos normais, com permanência da elevação de 1 a 2 semanas (BAYNES, DOMINICZAK, 2000).

A imunocromatografia é um método que utiliza anticorpos monoclonais de anti-troponina que reagem com a troponina existente em amostras de soro ou plasma. As amostras se movem a partir de uma membrana cromatográfica por ação capilar.

A importância do diagnóstico precoce do infarto do miocárdio, principalmente nas primeiras horas do início dos sintomas, é fator de estímulo para o aperfeiçoamento dos testes de dosagem da troponina, de tal forma que seja possível detectar níveis extremamente baixos dessa proteína no plasma, de maneira rápida e eficiente.

A troponina de alta sensibilidade (*high-sensitivity troponin*) é um método que permite maior sensibilidade para o diagnóstico de infarto agudo do miocárdio, esta é avaliada a partir de imunoensaio por quimioluminescência. Os kits são capazes de detectar até mesmo dano miocárdico mínimo, precocemente, e fornecer informações de maior acurácia clínica (CONRAD, JAROLIM, 2014; LEWANDROWSKI, 2014).

Os níveis plasmáticos da troponina, em condições normais, ou seja, sem alterações decorrentes de isquemia miocárdica, são baixos (menor que 0,01 µg/ml). Na presença de necrose miocárdica, ocorre liberação deste biomarcador no plasma, com valor igual ou superior a 0,1 µg/ml. Este processo ocorre em duas fases distintas. A primeira fase de liberação dura cerca de 3 a 5 horas, após a perda da função da membrana. A seguir, a troponina continua a ser liberada (fase tardia) por 5 ou mais dias, estando essa fase associada à destruição do aparelho contrátil e necrose celular (BAYNES, DOMINICZAK, 2000; WALLACH, 2003).

A TnI é detectada no sangue entre 2 a 6 horas após a lesão miocárdica e permanece elevada por 5 a 7 dias. Há detecção da TnT em tempo semelhante e elevação até 12 a 14 dias (NELSON, COX, 2011; WALLACH, 2003).

A Figura 2.6 representa a comparação entre as troponinas T e I, de acordo com a duração de níveis elevados destes biomarcadores na corrente sanguínea após a ocorrência da síndrome coronariana isquêmica. Ressalta-se que a troponina T permanece elevada durante maior período.

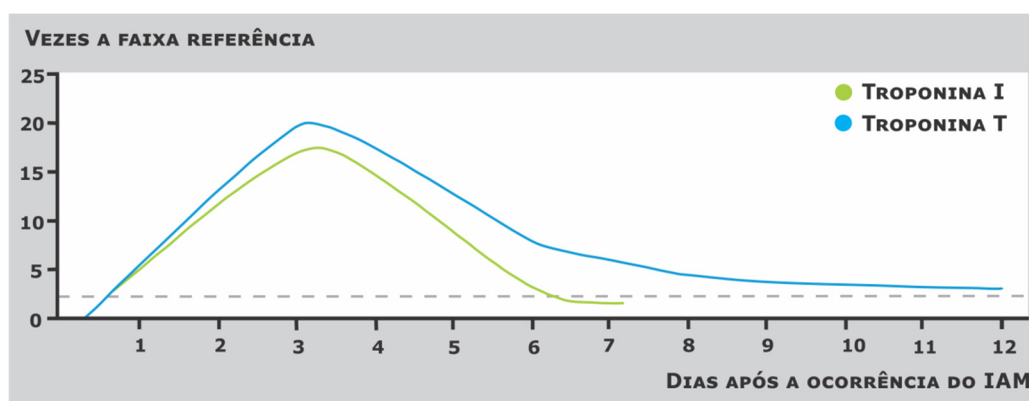


Figura 2.6. Tempo de elevação das troponinas T e I.

Medidas seriadas da troponina melhoram significativamente a capacidade deste biomarcador na detecção de infarto do miocárdio (LORIA *et al.*, 2008).

O aumento dos níveis de troponina representa um importante marcador de risco de morte ou infarto do miocárdio em pacientes com síndromes coronárias agudas, é um dos indicadores de estratégias invasivas precoces, como revascularização miocárdica. Além disso, há relação entre a gravidade do infarto e a duração da elevação sérica das troponinas cardíacas (LORIA *et al.*, 2008).

Sendo assim, a troponina destaca-se como um biomarcador importante, com ampla aplicação clínica (IVERSEN *et al.*, 2013; STRENG *et al.*, 2014).

As troponinas cardíacas permanecem elevadas por tempo prolongado, portanto, TnI e TnT são significativamente mais sensíveis que a fração MB da creatino quinase (CK-MB).

Portanto, as troponinas cardíacas T e I são importantes marcadores de lesão miocárdica, altamente sensíveis e amplamente utilizadas como auxílio diagnóstico do infarto do miocárdio. Estas proteínas são consideradas os biomarcadores mais específicos e com maior importância clínica para detecção de lesão miocárdica (VASATOVA *et al.*, 2013; WALLACH, 2003).

2.8.3.2 Proteína C reativa

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda, da família das pentraxinas, expressa por hepatócitos em resposta à inflamação sistêmica, em infecções bacterianas e outras situações clínicas que constituem processos inflamatórios. É capaz de reconhecer polissacarídeos microbianos, antígenos nucleares e células necróticas, além de opsonizar patógenos e células apoptóticas, com a ativação do sistema complemento (LU *et al.*, 2012).

A PCR possui uma sequência de 224 resíduos de aminoácidos, incluindo um peptídeo sinal de 18 resíduos responsável por sinalizar sua secreção. Estruturalmente, é um homopentâmero unido por ligações não-covalentes e os cofatores são dois íons de cálcio por subunidade. Sua nomenclatura refere-se à capacidade de precipitar polissacarídeo C pneumocócico na presença de cálcio (UNIPROT, 2013). A Figura 2.7 corresponde à sua estrutura tridimensional.

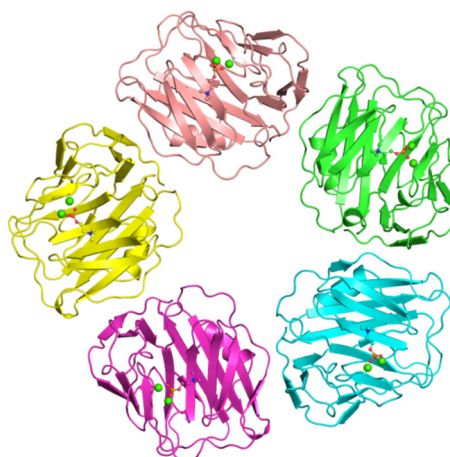


Figura 2.7. Modelo tridimensional da estrutura homopentamérica da PCR. As entidades não-poliméricas são íons cálcio e fosforilcolina (Protein Data Bank in Europe, 2014).

A PCR presente no sistema circulatório é sintetizada principalmente no fígado, com sua expressão em níveis constitutivos regulada pelo fator de transcrição NF-1 hepático, em níveis médios abaixo de 1 mg/L. Mediante resposta de fase aguda, sua expressão é induzida pelas citocinas IL-6 e IL-1 β , em níveis que variam de 10 a 500 mg/L (DU CLOS, 2013).

Entre os ligantes reconhecidos da PCR, está a fosforilcolina, presente em organismos patogênicos e na membrana de células de mamíferos, podendo ser exposta em células danificadas pela ação enzimática ou pela ativação do complemento. Outro ligante é a lipoproteína de baixa densidade (LDL) oxidada, o que pode explicar a presença desta pentraxina

em lesões ateroscleróticas. A PCR também se liga a antígenos nucleares, como histonas e ribonucleoproteínas, que são expostos ou liberados em células degradadas. Além disso, ativa o sistema do complemento e interage com receptores Fc, resultando na indução da resposta imunológica (DU CLOS, 2013).

O papel da PCR na ativação da cascata do complemento está associado à via clássica, por meio da ligação direta a C1q, o que tem implicações na defesa do hospedeiro e na regulação da inflamação. Além disso, ela está relacionada à prevenção da lise celular devida à ativação do complemento, com a promoção de opsonização e produção de citocinas. Também existem evidências da ativação do complemento pela PCR em lesões agudas, como o infarto agudo do miocárdio (DU CLOS, 2013).

Estudos epidemiológicos demonstraram uma associação entre o risco de eventos cardiovasculares e concentrações crescentes da proteína C reativa (GE, WANG, 2012; GILSTRAP, WANG, 2012; MONTGOMERY, BROWN, 2013), sendo tal associação observada em ambos os gêneros, em uma ampla faixa etária e em vários grupos étnicos (MADJID, WILLERSON, 2011).

Ainda é bastante debatido se existe um papel direto de níveis intermediários de PCR na causa de doenças cardiovasculares. Contudo, independentemente de sua participação na patogênese, a PCR é considerada um importante marcador do risco cardiovascular, de modo equivalente à análise de lipídeos (DU CLOS, 2013). Portanto, trata-se de um marcador de risco cardiovascular bem estabelecido (MADJID, WILLERSON, 2011).

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 (RAMASAMY, 2011) e aumento da captura de lipoproteína de baixa densidade (LDL) pelos macrófagos (MONTGOMERY, BROWN, 2013), fatores que contribuem para o desenvolvimento e progressão da placa aterosclerótica.

Em 2003, a Associação Americana do Coração (AHA – *American Heart Association*) emitiu um comunicado científico que sugeriu o uso de PCR como um fator de risco em pacientes com síndrome coronária aguda (SCA), com o estabelecimento de faixas de concentração associadas aos eventos cardiovasculares (SABATINE *et al.*, 2007).

Observa-se a possibilidade de estratificação de categorias de risco cardiovascular, de acordo com a concentração detectada de PCR (Figura 2.8). 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 (MONTGOMERY, BROWN, 2013).

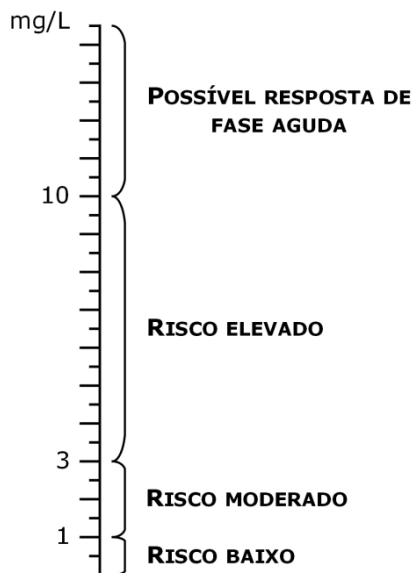


Figura 2.8. Estratificação de risco cardíaco de acordo com a concentração de PCR detectada no sangue (Adaptado de RIDKER, 2003).

No caso específico da síndrome coronária aguda (SCA), incluindo o infarto agudo do miocárdio, a PCR é usada como ferramenta de acompanhamento da evolução e prognóstico (KEHL *et al.*, 2012), principalmente na avaliação precoce de risco e individualização da terapia para SCA (RAMASAMY, 2011). Porém, devem ser considerados outros biomarcadores, para um diagnóstico completo e preciso (KEHL *et al.*, 2012).

Em 2006, Pepys e colaboradores conduziram um experimento que demonstrou o papel patogênico da PCR na lesão do infarto do miocárdio. Os pesquisadores desenvolveram uma pequena molécula (abreviada como Bis(PC)-H) que se liga à PCR em ratos, por meio da obstrução cirúrgica da artéria coronária esquerda. A um segundo grupo, foi administrada PCR humana após o evento cirúrgico. O terceiro grupo, além da PCR humana, também foi tratado com a molécula desenvolvida, Bis(PC)-H. A área do infarto foi maior no segundo grupo, enquanto o terceiro não apresentou diferenças significativas em relação ao grupo controle. Esses resultados indicam que a PCR humana, quando não inibida por Bis(PC)-H, esteve associada ao aumento do tamanho médio do infarto em ratos (PEPYS *et al.*, 2006).

Dados da literatura científica sugerem que a PCR, associada a outros biomarcadores, relaciona-se também à estratificação de risco, diagnóstico, predição de prognóstico e monitoramento da resposta ao tratamento em pacientes que sofreram acidente vascular cerebral

isquêmico (VANGILDER *et al.*, 2014), o que amplia a sua importância no âmbito das doenças cardiovasculares.

Entre as vantagens do uso de PCR como biomarcador para estratificação de risco de doenças cardiovasculares, destacam-se a estabilidade do analito, que não apresenta variação diurna; não há diferenças significativas associadas ao gênero, idade ou etnia do paciente e sua utilidade como marcador clínico é bem documentada, com estudos *in vivo* e *in vitro* (CALABRÒ, GOLIA, YEH, 2012). Contudo, é importante destacar a limitação de especificidade da PCR como biomarcador. Devido à associação da PCR com a inflamação, podem ocorrer alterações em sua concentração mediante uma variedade de condições, incluindo artrite reumatoide, lúpus eritematoso sistêmico, vasculite e neoplasias (CHAN, NG, 2010).

As técnicas analíticas mais utilizadas para quantificar PCR no sangue baseiam-se amplamente em imunoensaios, que incluem radioimunoensaio, ELISA, turbidimetria, aglutinação em látex e nefelometria. Atualmente, para avaliar a concentração de PCR em pacientes, a maior parte dos laboratórios de análises clínicas trabalha com aglutinação em látex ou nefelometria quantitativa. Contudo, enquanto a metodologia de aglutinação é apenas semiquantitativa, a imunonefelometria não possui limite de detecção apropriado. Esses métodos foram automatizados e melhorados, tornando-se mais sensíveis e reprodutíveis. Além dos imunoensaios, novas metodologias têm sido desenvolvidas para quantificação de PCR, como ensaios com fosforilcolina, ressonância de plasma de superfície, polímeros molecularmente impressos e biossensores (ALGARRA, GOMES, ESTEVES DA SILVA, 2012).

2.9 Prognóstico

O prognóstico no IAM depende da gravidade da obstrução na artéria coronária, da extensão da lesão miocárdica e da ocorrência de disfunções ventriculares e arritmias (CARNEIRO, 1997).

2.10 Tipos de tratamento

O tratamento do IAM pode ser realizado através da reperfusão química ou mecânica.

2.10.1 Reperusão química

Na reperusão química é bastante utilizado o tratamento fibrinolítico. Desde 1986, demonstrou-se que cerca de 30 mortes poderiam ser evitadas para cada 1.000 pacientes tratados nas primeiras seis horas e 20 entre 6 e 12 horas. O benefício chegou a 50 mortes evitadas, quando associado à aspirina. A associação com antiplaquetários evita a agregação plaquetária desencadeada pela trombina liberada após a fibrinólise, diminuindo a chance de reoclusão. Uma seleção de grandes estudos demonstrou que a mortalidade declinou cerca de 26% para pacientes reperfundidos nas primeiras três horas, 18% entre 3-6 horas e 14% entre 6-12 horas (COREY *et al.*, 1999).

O primeiro fibrinolítico testado com eficiência no IAM foi a estreptoquinase, com 18% de diminuição da mortalidade geral. O acompanhamento desses pacientes mostrou persistência do benefício até 11 anos após a fibrinólise executada na primeira hora dos sintomas. Posteriormente, em 1988, comprovou-se o benefício e segurança da associação de estreptoquinase e AAS (ácido acetilsalicílico) (JULIAN, COWAN, 1996). A escolha do fibrinolítico depende de uma avaliação de risco-benefício (BARBAGELATA *et al.*, 2004).

Após a utilização do fibrinolítico, em torno de 60 minutos, nota-se diminuição do supradesnivelamento do segmento ST maior do que 50%, arritmias de reperusão e melhora da dor. Porém os pacientes que não apresentam sucesso na reperusão farmacológica devem ser submetidos se possível, à angioplastia (ALPERT, THYGESEN, 2000).

2.10.2 Reperusão mecânica

A precocidade da reperusão e a manutenção de fluxo ótimo estão diretamente relacionadas ao prognóstico do infarto (HAHN, CHANDLER, 2006).

Um estudo europeu revelou que nas primeiras 3 horas do início dos sintomas, os métodos de reperusão química e mecânica foram equivalentes. No entanto, a angioplastia primária mostrou-se superior aos fibrinolíticos em relação à mortalidade, reinfarto e acidente vascular cerebral (AVC), em uma meta-análise com 23 estudos comparando os métodos. Observou-se a diminuição da mortalidade de 9% com tratamento farmacológico para 7% com angioplastia (ALPERT, THYGESEN, 2000).

Devem-se realizar eletrocardiogramas seriados para monitorização do segmento ST, curva dos marcadores bioquímicos de lesão miocárdica e coronariografia quando necessário,

para o acompanhamento clínico do paciente e realização da reperfusão caso seja preciso (COREY *et al.*, 1999).

CAPÍTULO 3

3 BIOSSENSORES ASSOCIADOS À SÍNDROME CORONÁRIA AGUDA

3.1 Introdução

As alterações bioquímicas produzidas pelo infarto agudo do miocárdio são oriundas da liberação de biomoléculas para a corrente sanguínea, a partir da membrana sarcolemal comprometida. O aumento da concentração de biomarcadores indicativos da lesão cardíaca pode ser monitorado pela realização de testes de dosagem no soro, fornecendo informações relevantes para confirmação do diagnóstico, bem como para determinação da severidade e estágio desta lesão, a partir da quantificação desses biomarcadores (LEWANDROWSKI, 2014; NELSON, COX, 2011; VASATOVA *et al.*, 2013).

A alta incidência de cardiopatias e a importância do diagnóstico precoce do infarto do miocárdio, principalmente nas primeiras horas do início dos sintomas, são fatores de estímulo para o aperfeiçoamento dos testes de dosagem de marcadores moleculares de lesão miocárdica, de tal forma que seja possível detectar níveis extremamente baixos destas biomoléculas no plasma, de maneira rápida, eficiente e com baixo custo, características encontradas em biossensores.

3.2 Biossensores

Um biossensor é um dispositivo que responde de forma seletiva a um analito particular, tornando possível sua determinação qualitativa ou quantitativa. Nos biossensores, o analito (alvo) é reconhecido seletivamente por um material biológico (sonda), o qual é imobilizado em um transdutor, produzindo um sinal quantitativo proporcional à concentração do analito. Os componentes biológicos são utilizados como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado na reação com o analito (WANG, 2000).

Os biossensores são formados por um sistema de reconhecimento molecular (biorreceptor), acoplado a um transdutor e a uma unidade processadora de sinal (Figura 3.1).



Figura 3.1. Configuração de um biossensor.

O sistema de reconhecimento inclui um biocomponente (enzimas, tecidos, anticorpos, ácidos nucleicos, aptâmeros, entre outros) que entram em contato com o analito de interesse, produzindo um sinal (CHAMBERS *et al.*, 2008; LEE, 2008).

Dentre os biossensores para diagnóstico de doenças, é relevante destacar os imunossensores, que se baseiam na especificidade da interação antígeno-anticorpo. Os anticorpos e antígenos, assim como as demais biomoléculas, são incorporados sobre um transdutor, mais comumente pelas seguintes metodologias: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada ou encapsulamento. As metodologias de incorporação visam reter a máxima quantidade e atividade possível do elemento biorreconhecedor na superfície do transdutor. Deste modo, a incorporação dos componentes de reconhecimento sobre a superfície do biossensor representa fator determinante para o bom funcionamento do mesmo, o que inclui as condições adequadas de sensibilidade e especificidade (MURPHY, 2006).

O analito, ao entrar em contato com o biorreceptor imobilizado na superfície do biossensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, massa, índice de refração, corrente elétrica, potencial, resistência elétrica, capacitância, dentre outras) que pode ser identificada por um transdutor, gerando sinal elétrico resultante, que é então processado. O

sistema de aquisição, processamento e visualização dos dados fornece informações sobre a detecção e quantificação de analito na amostra (Figura 3.2).

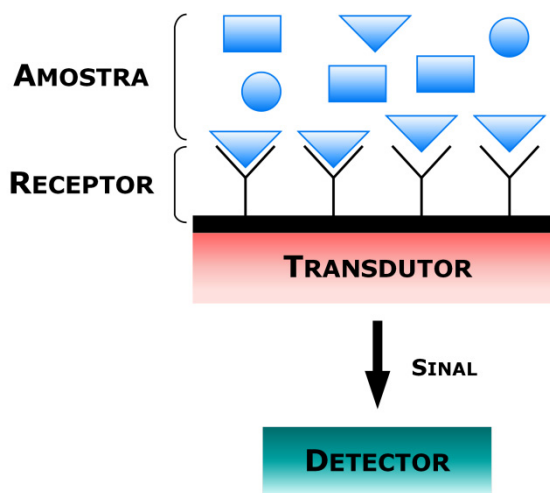


Figura 3.2. Principais componentes de um biossensor.

O transdutor pode ser eletroquímico (potenciométrico, amperométrico ou condutimétrico), piezoelétrico, calorimétrico ou óptico (LEE, 2008; MEHRVAR *et al.*, 2000).

No transdutor potenciométrico, o potencial é gerado a partir da diferença de potencial entre um eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, o qual varia com a atividade ou concentração da molécula analisada. A diferença de potencial entre os eletrodos é relacionada à concentração do analito (THÉVENOT *et al.*, 2001). O transdutor amperométrico mede a intensidade de corrente de uma célula eletroquímica a um potencial fixo, sendo a corrente gerada por reações de oxidação e redução na superfície do biossensor, que são proporcionais à concentração do analito (CALVOA, DANILOWICZ, 1997). Já o transdutor condutimétrico é utilizado para biorreconhecimento do substrato pela sonda biológica e ocasiona modificações na condutividade elétrica do sistema (TURNER, KARUBE, WILSON, 1987).

O transdutor piezoelétrico ou detector de massa é um dispositivo que possui um cristal oscilante para alternar a frequência, sendo observada variação da oscilação mecânica do cristal, de acordo com a mudança de massa. Os cristais são recobertos com biomoléculas que devem apresentar alta seletividade para detecção da molécula de interesse (BABACAN *et al.*, 2000).

Os biossensores calorimétricos são utilizados para reações com importante conversão de entalpia. O calor ocasiona aumento de temperatura que pode ser relacionada com a concentração do analito (DANIELSSON, 1990).

Os transdutores ópticos atuam por meio de medidas de absorção ou emissão de luz a partir de uma reação biológica. Neste tipo de biossensor, ondas de luz são guiadas por meio de

fibras ópticas para um detector adequado (ZHANG, HOSHINO, 2014). Um exemplo é a ressonância de plasma de superfície (SPR). O princípio de desenvolvimento dos sensores de 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 (GREEN *et al.*, 2000). Além disso, é possível monitorar a refletividade em função da variação do comprimento de onda (HANKEN *et al.*, 1998).

3.3 Sistemas e tecnologias existentes

A seguir serão analisados os métodos de quantificação de dois marcadores muito utilizados na prática clínica para o diagnóstico e acompanhamento da evolução dos pacientes acometidos por infarto do miocárdio, a troponina T (TnT) e a proteína C reativa (PCR).

A troponina destaca-se entre os biomarcadores, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e importância clínica (SINGH *et al.*, 2010). Os métodos laboratoriais mais utilizados para quantificação da troponina são: imunoensaio por eletroquimioluminescência, teste imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) e imunocromatografia.

Já a proteína C reativa está relacionada à fisiopatologia de doenças arteriais coronárias. Esta é uma proteína de fase aguda que é considerada um marcador para inflamação, neste caso, do processo inflamatório decorrente de doenças ateroscleróticas (ALDOUS, 2013). As técnicas mais utilizadas para quantificar a PCR são imunoensaio, que incluem radioimunoensaio, ELISA, turbidimetria, aglutinação em látex e nefelometria.

A maior eficácia dos testes com biossensores em relação às técnicas existentes para detecção destes biomarcadores é referente à otimização do tempo para esta quantificação, que permite o diagnóstico em tempo real, propiciando um tratamento precoce e melhor prognóstico para os pacientes. Além destes parâmetros, é relevante ressaltar também a importância do desenvolvimento e utilização de biossensores em análise clínica, pois apresentam tamanho

reduzido, baixo custo e elevada sensibilidade, além de requerer pequeno volume de amostras de sangue dos pacientes (CHEN *et al.*, 2005; TYMECKI, KONCKI, 2006).

3.4 Biossensores para detecção de troponinas

Os biossensores são desenvolvidos com a finalidade de detectar interações em nível celular e molecular em tempo real, a partir da obtenção de dispositivos com alta sensibilidade quando comparados aos métodos convencionais (KOHLES *et al.*, 2011). Alguns biomarcadores são encontrados normalmente no plasma sanguíneo em baixas concentrações, o aumento dos níveis destes biomarcadores é indicativo de lesão de tecidos ou órgãos.

O aumento dos níveis do biomarcador troponina é um dos indicadores de estratégias invasivas precoces, como revascularização miocárdica. Além disso, há relação entre a gravidade do infarto e a duração da elevação sérica das troponinas cardíacas (COLLINSON, BOA, GAZE, 2001; LORIA *et al.*, 2008; NICOLAU *et al.*, 2014).

As troponinas T e I são consideradas um padrão-ouro para o diagnóstico de lesão miocárdica. Estas proteínas são conhecidas como os biomarcadores mais específicos e com maior importância clínica para detecção de lesão miocárdica (CONRAD, JAROLIM, 2014; IVERSEN *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2012; STRENG *et al.*, 2014).

Os níveis plasmáticos da troponina T, em condições normais, ou seja, sem alterações decorrentes de isquemia miocárdica, são menores que 0,01 µg/ml. Na presença de necrose miocárdica, ocorre liberação deste biomarcador no plasma, com valor igual ou superior a 0,1 µg/ml (LEWANDROWSKI, 2014).

Diversos tipos de sensores têm sido desenvolvidos e analisados para detecção e quantificação das troponinas cardíacas e para o diagnóstico de síndrome coronária aguda.

Um imunossensor piezoelétrico, com base em nanopartículas de ouro imobilizadas sobre uma superfície, foi proposto para a detecção de troponina T. O anticorpo anti troponina T humana foi imobilizado sobre a superfície do eletrodo, para posterior interação com o antígeno, troponina T, proveniente de amostras de soro humano. Estudos de voltametria cíclica foram utilizados. O imunossensor apresentou bom desempenho em amostras reais. A faixa linear de resposta foi de 0,003 ng/mL a 0,5 ng/mL e limite de detecção de 0,0015 ng/mL ($r = 0,989$, $p < 0,01$). O imunossensor desenvolvido pode ser utilizado no diagnóstico de infarto do miocárdio, demonstra alta sensibilidade, rápida análise e facilidade de utilização para os usuários (FONSECA *et al.*, 2011).

Há ainda, pesquisas com transdutores ópticos para detecção de troponinas, nos quais o desenvolvimento de imunossensores para detecção de troponina T pode ser realizado com a utilização de um eletrodo de ouro para imobilização do anticorpo. A detecção da interação antígeno-anticorpo pode ser feita por meio da ressonância de plasma de superfície. Uma pesquisa demonstra ligação específica da troponina T no dispositivo desenvolvido, limite de detecção de 100 ng/ml ($r = 0,991$, $p < 0,0009$). O sensor demonstrou alta capacidade de detecção, alta precisão e reprodutibilidade (LIU *et al.*, 2011).

Ademais, um biossensor para detecção de troponina I (TnI) foi desenvolvido a partir da utilização de nanopartículas de ouro. O princípio de detecção é fundamentado na variação de capacitância a partir da reação antígeno-anticorpo. Esta reação provoca variação da capacitância do sistema devido às respostas das moléculas biológicas. Nanopartículas de ouro foram depositadas sobre os eletrodos impressos. O anticorpo anti TnI foi imobilizado na matriz de ouro e caracterizado por microscopia confocal. A troponina I foi detectada com êxito e apresentou limite de detecção de 0,2 ng/mL. Este dispositivo apresenta, como principais vantagens, o baixo custo e rápido tempo de resposta (BHALLA *et al.*, 2012).

Além disso, eletrodos impressos (*screen printed*) têm sido amplamente utilizados no desenvolvimento de sensores. Estes eletrodos propiciam avanços na utilização de biossensores para análise clínica. Há uma pesquisa que foi realizada com a utilização de microesferas de poliestireno com estreptavidina, as quais foram incorporadas na superfície do eletrodo impresso, com a finalidade de aumentar a resposta analítica da troponina T. A utilização do sistema estreptavidina-biotina permitiu o aumento da sensibilidade e estabilidade do imunossensor para troponina T. A superfície do imunossensor foi caracterizada por microscopia eletrônica de varredura e voltametria cíclica. Observou-se que a utilização de microesferas de poliestireno sensibilizadas com estreptavidina aumentou significativamente a sensibilidade analítica do eletrodo, demonstrando uma curva com uma faixa linear de resposta entre 0,1 ng/mL e 10 ng/mL de TnT e um limite de detecção de 0,2 ng/mL. O sensor proposto possui alta sensibilidade e permite a detecção de TnT para aplicação clínica (SILVA *et al.*, 2010).

A tecnologia de eletrodos impressos possibilita o desenvolvimento de sensores que podem ser fabricados em larga escala e, devido ao baixo custo, podem ser descartados após a utilização.

Portanto, com a utilização desse dispositivo, a detecção do biomarcador a ser analisado pode ser realizada posteriormente à coleta de sangue da polpa digital do paciente. Esses eletrodos possibilitam o desenvolvimento de sensores comerciais, a partir da fabricação de um

sistema completo, o qual contém os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência impressos no mesmo suporte.

3.5 Biossensores para detecção de proteína C reativa

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda, liberada em processos inflamatórios. Há associação entre o risco de eventos cardiovasculares e concentrações crescentes da PCR (GE, WANG, 2012; GILSTRAP, WANG, 2012; MONTGOMERY, BROWN, 2013).

Diversas pesquisas para detecção e quantificação da proteína C reativa a partir do desenvolvimento de biossensores têm sido descritas. Dentre elas, destaca-se um trabalho com a utilização de nanofibras de carbono, que foram utilizadas para fabricar *arrays* de nanoeletrodos. As técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica foram utilizadas para a detecção de PCR. Detectou-se a imobilização de anti-PCR sobre o eletrodo e a interação da sonda PCR com o alvo anti-PCR, sobre a superfície do transdutor. O limite de detecção do sensor foi de 90 pM ou 11 ng/mL, valores que são clinicamente relevantes. Os testes controle confirmaram a especificidade do dispositivo (GUPTAA *et al.*, 2014).

Observa-se ainda um método de alta sensibilidade para detectar PCR, a partir da utilização de uma microbalança de cristal de quartzo e nanopartículas de ouro conjugadas a anticorpos anti-PCR. A proteína C reativa foi reconhecida pelo anticorpo, o qual foi imobilizado sobre o eletrodo de ouro. A resposta da microbalança de cristal de quartzo é linear em relação à concentração de PCR no intervalo de 20 ng/mL - 30 µg/mL (DING *et al.*, 2013).

Além disso, a interação entre a PCR e seu anticorpo específico (anti-PCR), imobilizado sobre a superfície de um eletrodo de ouro, foi avaliada por meio de técnicas eletroquímicas. O eletrodo foi funcionalizado com cisteamina e glutaraldeído, criando uma camada automontada que interagiu covalentemente com o eletrodo (via ligação tiol-ouro) e com o anticorpo (via ligação aldeído-amina). O sistema foi capaz de detectar concentrações de PCR de $1,15 \times 10^{-5}$ mg/L (HENNESSEY *et al.*, 2009). Outra pesquisa, que também utilizou eletrodos de ouro e camadas automontadas para desenvolver um biossensor para PCR, apresentou um limite de detecção de 176 pmol/L (BRYAN *et al.*, 2013).

Em outro trabalho, verificou-se a aplicação de eletrodo impresso para detecção da PCR. Utilizou-se um polímero e eletrodo impresso de carbono. A superfície modificada foi caracterizada por microscopia de força atômica e análises de microscopia eletrônica de varredura. O limite de detecção foi de 0,04 ng/L. A eficácia do sensor foi também realizada em

soro sanguíneo humano. O dispositivo apresentou características desejáveis, tais como seletividade e especificidade (KUMAR, PRASAD, 2012).

3.6 Conclusão e perspectivas

O desenvolvimento e aplicações clínicas de biossensores contribuem para o 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 da síndrome coronária aguda.

A nanotecnologia possibilita o desenvolvimento de dispositivos nanométricos utilizando nanopartículas, nanofios e nanotubos em sensores biológicos (CHOI *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2009) para detecção de interações moleculares em tempo real, por meio do desenvolvimento dos biossensores que apresentam capacidade de detecção em tempo real, especificidade, seletividade, sensibilidade e maior especificidade em relação aos métodos convencionais. Outros fatores importantes incluem a redução do tempo de resposta do sensor, acréscimo da estabilidade e obtenção de limite de detecção em concentração até zeptomolar.

O desenvolvimento e utilização de biossensores apresentam importantes avanços científicos e possibilidade de aplicação clínica, já que novos dispositivos e materiais estão sendo testados por diversos centros de pesquisa.

Destaca-se, portanto, a importância de diagnóstico em tempo real para que, se necessário, a revascularização miocárdica seja realizada precocemente, o que possibilita um tratamento mais eficaz, além de melhorar o prognóstico dos pacientes. Os biossensores para detecção de marcadores moleculares de lesão miocárdica são promissores e as pesquisas laboratoriais são conectadas aos testes clínicos para validação e otimização dos dispositivos desenvolvidos.

CAPÍTULO 4

4 DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSENSOR PARA DETECÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA

4.1 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 o tempo de evolução da obstrução (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; CLIFFORD, 2006).

Marcadores bioquímicos cardíacos são componentes das estruturas celulares liberadas na circulação quando ocorre lesão do miocárdio. Os testes para quantificação dessas macromoléculas em soro humano são relevantes devido à obtenção de informações associadas à severidade e estágio evolutivo da lesão cardíaca (BRIEGER *et al.*, 2004; GILSTRAP, WANG, 2012).

A PCR é considerada um marcador padrão-ouro para inflamação e está relacionada a doenças cardiovasculares. Evidências indicam que a aterosclerose é uma doença inflamatória imune-mediada (RIDKER, 2003).

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.

Os imunossensores se fundamentam na especificidade da interação antígeno-anticorpo. Os anticorpos e antígenos são incorporados sobre um transdutor, mais comumente pelas

seguintes metodologias: adsorção, ligação covalente, ligação cruzada ou encapsulamento. As metodologias de incorporação visam reter a máxima quantidade e atividade possível do elemento biorreconhecedor na superfície do transdutor. Sendo assim, a incorporação dos componentes de reconhecimento sobre a superfície do biossensor representa fator determinante para o bom funcionamento do mesmo (NAKAMURA, SUCHIYA, OHANA, 2014).

O analito, ao entrar em contato com o biorreceptor imobilizado na superfície do biossensor, produz uma mudança físico-química (variação de calor, massa, índice de refração, corrente elétrica, potencial, resistência elétrica, capacitância, dentre outras) que pode ser identificada por um transdutor, gerando sinal elétrico resultante, que é então processado. O sistema de aquisição, processamento e visualização dos dados fornece informações sobre a detecção e quantificação de analito na amostra.

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 (ZHANG, HOSHINO, 2014). Um exemplo é a ressonância de plasma de superfície (SPR).

Além disso, a tecnologia de eletrodos impressos possibilita o desenvolvimento de sensores que podem ser fabricados em larga escala e, devido ao baixo custo podem ser descartados após a utilização. Portanto, com a utilização desse dispositivo, a detecção do biomarcador a ser analisado pode ser realizada posteriormente à obtenção de pequena quantidade de sangue do paciente. Esses eletrodos possibilitam o desenvolvimento de sensores comerciais, a partir da fabricação de um sistema completo, o qual contém os eletrodos de trabalho, auxiliar e referência impressos no mesmo suporte.

Os eletrodos impressos são dispositivos baseados em diferentes camadas de tintas de impressão em um plástico inerte ou substrato de cerâmica em miniatura. Além disso, são facilmente produzidos em massa a baixo custo, mantendo as características que proporcionam aos biossensores qualidade superior em comparação com materiais eletrônicos convencionais.

Devido às áreas reduzidas, os eletrodos impressos utilizam quantidades muito pequenas de amostra para o diagnóstico e podem ser descartáveis. Além disso, os mesmos possuem inércia química, rugosidade e potencial para a incorporação de biomoléculas, mostrando-se eficientes no desenvolvimento do imunossensor (RAMA, GONZALEZ-GARCIA, COSTA-GARCIA, 2014).

Sabe-se da literatura que o ouro possui afinidade com os compostos que contém em sua estrutura átomos de enxofre e/ou nitrogênio (ASHWELL *et al.*, 2011; NAKAMURA,

SUCHIYA, OHANA, 2014). Considerando essa afinidade, espera-se que em uma solução contendo anticorpos, em contato com uma superfície de ouro, ocorra a interação anticorpo-ouro, por meio de ligações covalentes, promovendo assim modificação na superfície (OLIVEIRA *et al.*, 2015). A integridade desta modificação é um fator importante a ser considerado e pode ser avaliada comparando a contribuição anódica ou catódica do eletrodo limpo e do eletrodo modificado (FERREIRA *et al.*, 2009). Dados da literatura confirmam que os compostos formados por amino-tióis possuem grupos substituintes que competem pela ligação com ouro (ASHWELL *et al.*, 2011).

Um biomarcador ideal deve ser altamente sensível, específico, acessível, padronizado e de fácil interpretação, sendo utilizado na estratificação de risco e no monitoramento de pacientes acometidos por patologias, tais como doenças cardíacas isquêmicas, precordialgia, suspeita de síndromes coronarianas e manifestações de insuficiência cardíaca. Os biomarcadores podem também ser utilizados para verificar suscetibilidade a doenças e elegibilidade para terapias específicas (RIDKER, 2003; SINGH *et al.*, 2010).

Este trabalho apresenta um método de desenvolvimento de um imunossensor baseado na interação do anticorpo anti-PCR e antígeno PCR, utilizando os eletrodos impressos de ouro como plataforma e solução de ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$, 5 mmol.L⁻¹) e cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol.L⁻¹) como indicador eletroquímico.

O objetivo desta pesquisa 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 e eletrodos impressos (*screen printed*), com a finalidade de desenvolver um biossensor a partir da interação antígeno-anticorpo para detecção e discriminação desta molécula.

O imunossensor foi desenvolvido sobre a superfície do eletrodo de ouro e avaliado por voltametria de pulso diferencial e ressonância de plasma de superfície.

4.2 Experimentos

4.2.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico sem purificação anterior. Água ultra pura (Master System, Gehaka, Brasil) foi utilizada para a preparação de todas as soluções. Anti proteína C reativa (anticorpo) e proteína C reativa sintética (antígeno) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções de anticorpo e antígeno foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (Na₂HPO₄ 0,061 mol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0,039 mol.L⁻¹, pH 7,3). O soro humano foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

Utilizou-se solução de ácido sulfúrico para remover impurezas do eletrodo (0,5 mol.L⁻¹, pH 0,4). A detecção da proteína C reativa foi realizada em solução de ferrocianeto de potássio: K₄Fe(CN)₆.3H₂O (5 mmol.L⁻¹) em cloreto de potássio: KCl (0,10 mol.L⁻¹). As soluções foram deaeradas com nitrogênio ultra puro antes da utilização.

Os eletrodos de ouro para utilização no SPR foram adquiridos da Metrohm Autolab (Brasil) e os eletrodos de ouro *screen printed* DRP 220 AT da Drop Sens. As soluções de bloqueio utilizadas foram albumina sérica bovina (BSA) 0,5% e caseína 1%.

4.2.2 Equipamentos

Os testes eletroquímicos foram realizados em um potenciostato da CH Instruments, modelo 760C. Foram utilizados eletrodos de ouro *screen printed* DRP 220 AT, os quais são compostos por um eletrodo de trabalho feito de uma tinta de ouro com diâmetro de 4 mm, um eletrodo referência que contém tinta condutora de prata e um contra-eletrodo produzido a partir de uma tinta condutora de ouro, o eletrodo foi impresso em uma superfície de cerâmica, por meio da utilização de tinta de cura de alta temperatura.

A espectroscopia de impedância eletroquímica foi realizada em um sistema eletroquímico Autolab (PGSTAT302N) e *software* NOVA 1.10.

O equipamento de ressonância de plasma de superfície modelo Springle (Autolab) foi utilizado para desenvolver o sensor óptico para a proteína C reativa.

Avaliou-se a morfologia do eletrodo na ausência e na presença de biomoléculas por microscopia de força atômica (AFM) (Shimadzu SPM 9600, *tapping mode*).

4.2.3 Coleta de soro humano e quantificação da proteína C reativa

As coletas de soro dos pacientes foram realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFU, número do parecer 721.990.

A quantificação da proteína C reativa foi realizada por teste imunoturbidimétrico para pacientes acometidos por infarto agudo do miocárdio e para pacientes sem alterações relacionadas à síndrome coronária aguda, os quais apresentaram concentrações de PCR em torno de $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$.

4.2.4 Imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de ouro *screen printed*

Realizou-se uma avaliação sobre a superfície do eletrodo de ouro *screen-printed* DRP 220 AT em solução de ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$, pH 0,4) para verificar a qualidade do eletrodo, que é indispensável para o processo de desenvolvimento de um imunossensor. Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, foram aplicados 2 ciclos em uma faixa de potencial de +0,20 V a +1,20 V com velocidade de varredura $50 \text{ mV}.\text{s}^{-1}$.

Utilizou-se anticorpo (anti-PCR, $4 \mu\text{L}$, $12,5 \mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$) e antígeno (PCR sintética ou soro de pacientes acometidos por infarto do miocárdio, $4 \mu\text{L}$). Os processos de imobilização do anticorpo e interação antígeno-anticorpo foram realizados a 26°C por 40 minutos. Utilizou-se solução de albumina sérica bovina (BSA) para bloquear a superfície de ouro durante 1 hora a 12°C e as lavagens foram realizadas com tampão fosfato entre as fases de imobilização, bloqueio da superfície e adição do antígeno. Foram realizados testes com soros positivo e negativo para PCR (Figura 4.1).

Para os testes de voltametria de pulso diferencial foi utilizada a solução de $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6.3\text{H}_2\text{O}$ ($5 \text{ mmol}.\text{L}^{-1}$) em KCl ($0,10 \text{ mol}.\text{L}^{-1}$) como solução eletrolítica.

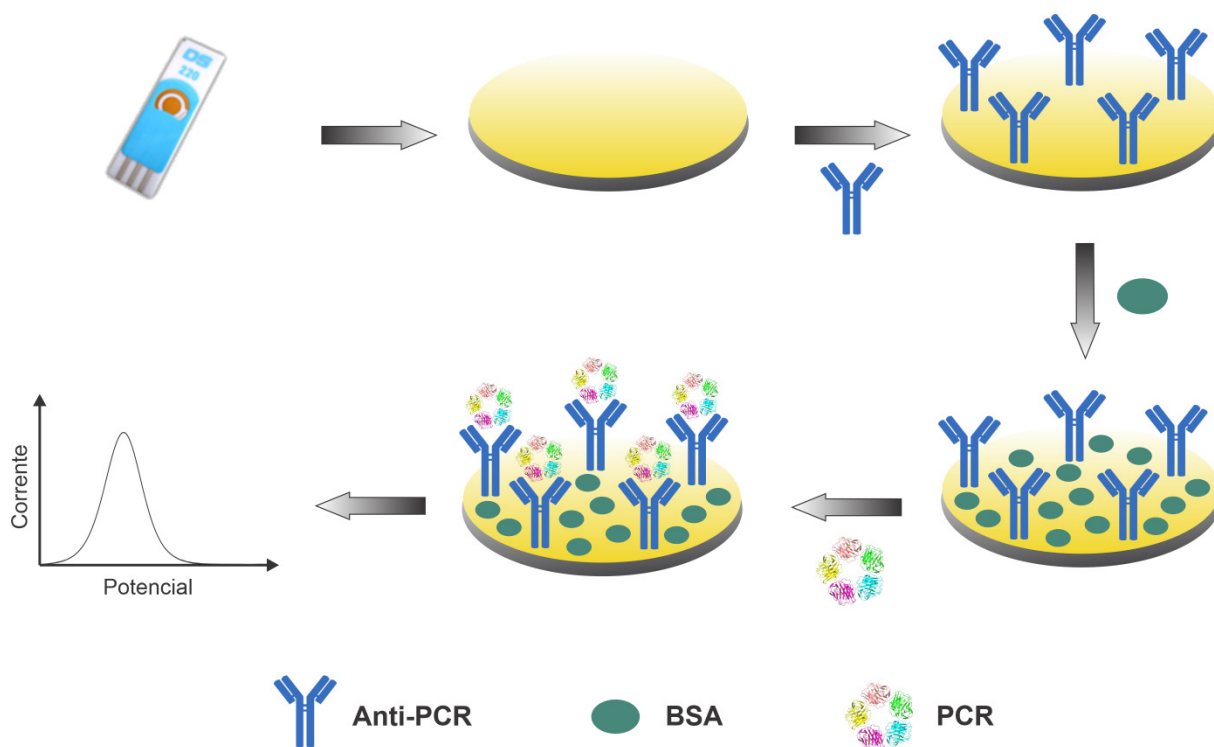


Figura 4.1. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de ouro screen printed.

4.2.5 Imunossensor desenvolvido com a utilização de ressonância de plasma de superfície

Para a limpeza do eletrodo de ouro utilizou-se ácido sulfúrico e peróxido de hidrogênio na proporção 3:1, por ser um forte oxidante e remover de forma eficaz as impurezas presentes na superfície do eletrodo.

Após a inserção do eletrodo de ouro sobre o prisma do SPR foram realizadas duas lavagens com 200 μL de tampão fosfato. A linha de base foi realizada em tampão fosfato. Posteriormente, foram colocados 100 μL de anticorpo (anti-PCR), com concentração de 12,5 $\mu\text{g/mL}$, na superfície do eletrodo de ouro durante 40 minutos. Utilizou-se solução de caseína 1% para bloquear a superfície de ouro durante 1 hora e as lavagens foram realizadas com tampão fosfato entre as fases de imobilização, bloqueio da superfície e adição de antígeno. Os experimentos foram realizados em uma temperatura de 26°C (Figura 4.2).

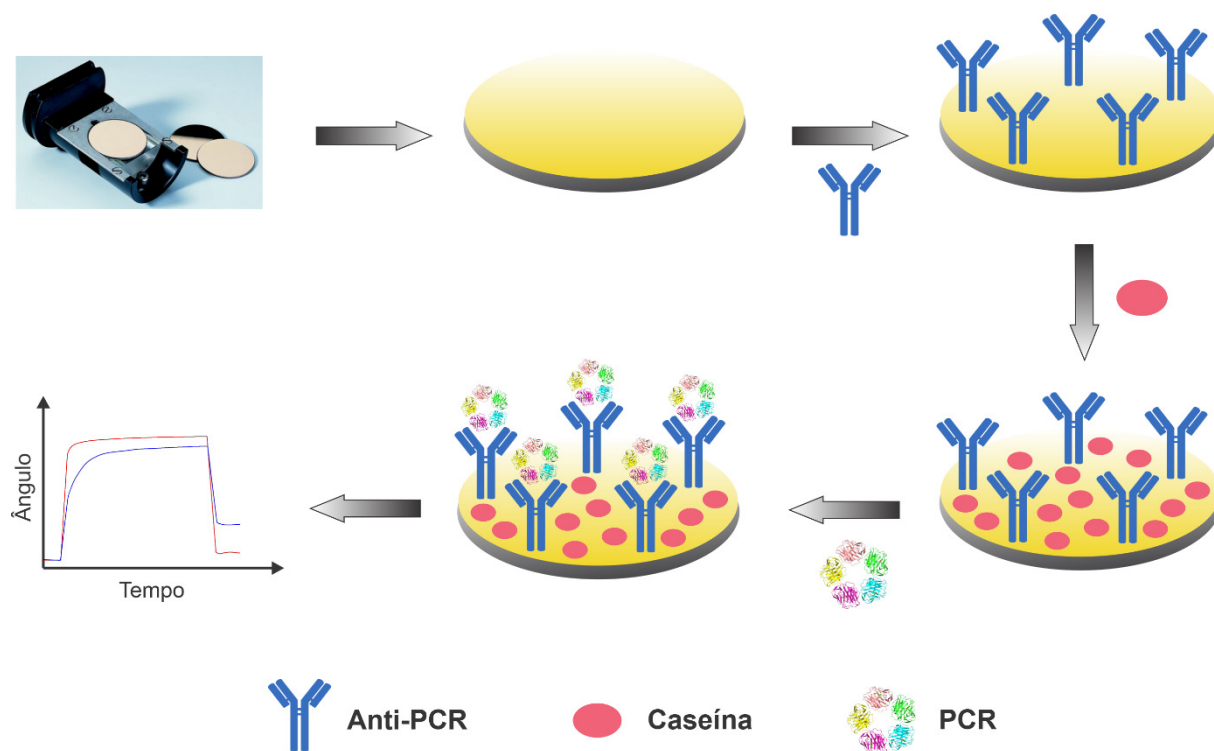


Figura 4.2. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de ressonância de plasma de superfície.

4.2.6 Curva de calibração

A análise da eficiência dos imunossensores foi testada primeiramente com proteína C reativa sintética, sendo que diferentes concentrações de antígeno foram utilizadas para a definição da curva de calibração ($6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Os mesmos protocolos dos itens 4.2.4 e 4.2.5 foram utilizados para a realização de testes com amostras reais (soro de pacientes acometidos por infarto do miocárdio) utilizando voltametria de pulso diferencial e ressonância de plasma de superfície.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização eletroquímica do imunossensor

Para verificar a qualidade e a viabilidade da superfície do eletrodo *screen-printed* DRP 220 AT e para constatar se houve modificação eletroquímica na presença do anticorpo, realizou-se teste em ácido sulfúrico ($0,5 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 0,4).

Os eletrodos *screen-printed* DRP 220 AT apresentam perfil eletroquímico semelhante, sendo assim, as superfícies dos eletrodos utilizados na confecção do imunossensor são reprodutíveis. Na presença do anticorpo, após lavagem, observa-se que houve mudança no perfil eletroquímico do ácido sulfúrico, comprovando a modificação.

Os materiais contendo enxofre desempenham um papel importante na estrutura de biomoléculas e revelam boa afinidade com ouro, promovendo uma funcionalização eficiente (NAKAMURA, SUCHIYA, OHANA, 2014). Desta forma os eletrodos *screen-printed* tornam-se relevantes para o desenvolvimento de imunossensores.

Para verificar a modificação eletroquímica do *screen-printed* foram realizados testes eletroquímicos utilizando a solução de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ - 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl - $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), mostrados na Figura 4.3.

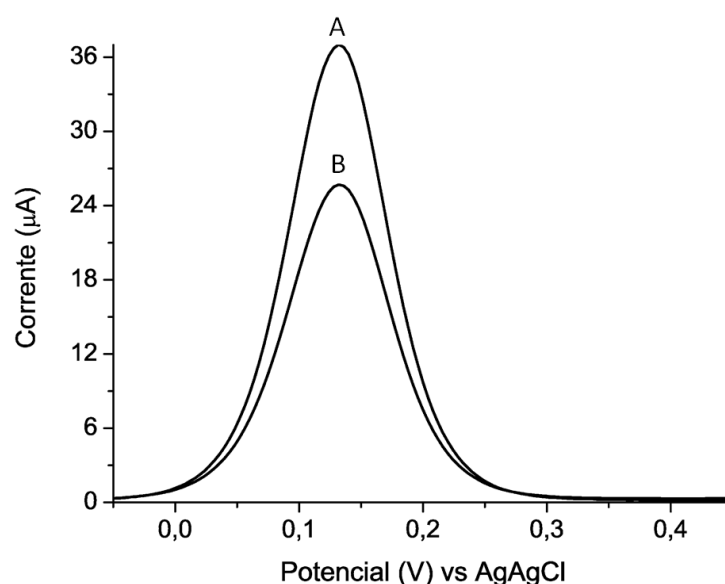


Figura 4.3. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo *screen-printed* limpo (A), modificado com anti-PCR ($12,5 \text{ µg.mL}^{-1}$) (B), utilizando o de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) em cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como mediador eletroquímico, pH 7.4. Modulação de amplitude: 25 mV . Intervalo de pulso: $0,2 \text{ s}$; 20 mVs^{-1} .

Na avaliação do perfil eletroquímico do eletrodo *screen-printed* funcionalizado com o anticorpo anti-PCR frente ao mediador ferrocianeto de potássio, observa-se um valor de corrente inferior em comparação ao eletrodo *screen-printed* limpo.

Este resultado sugere que houve uma força de repulsão entre a superfície modificada do eletrodo e a sonda utilizada, diminuindo a transferência eletrônica e, consequentemente, dificultando as propriedades eletrônicas do eletrodo. Sabe-se que este indicador eletroquímico apresenta características aniônicas e, portanto, sugere-se que a adsorção do anticorpo tem, sobre a superfície, um comportamento aniônico.

4.3.2 Curva de calibração eletroquímica

Na construção de imunossensores faz-se necessário o cálculo do limite de detecção (LD), que fornece informações a respeito da sensibilidade e a menor quantidade do analito presente na amostra capaz de ser detectado. Além disso, faz-se o cálculo do limite de quantificação (LQ), o qual indica a menor quantidade do analito presente na amostra que pode ser quantificado com precisão e exatidão.

Sendo assim, construiu-se uma curva de calibração a partir da análise dos voltamogramas de oxidação do ferrocianeto de potássio. No desenvolvimento do imunossensor, manteve-se a concentração do anticorpo específico: anti-PCR ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e variou-se as concentrações do antígeno: PCR ($6,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $37,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), conforme pode ser observado nas Figuras 4.4 e 4.5.

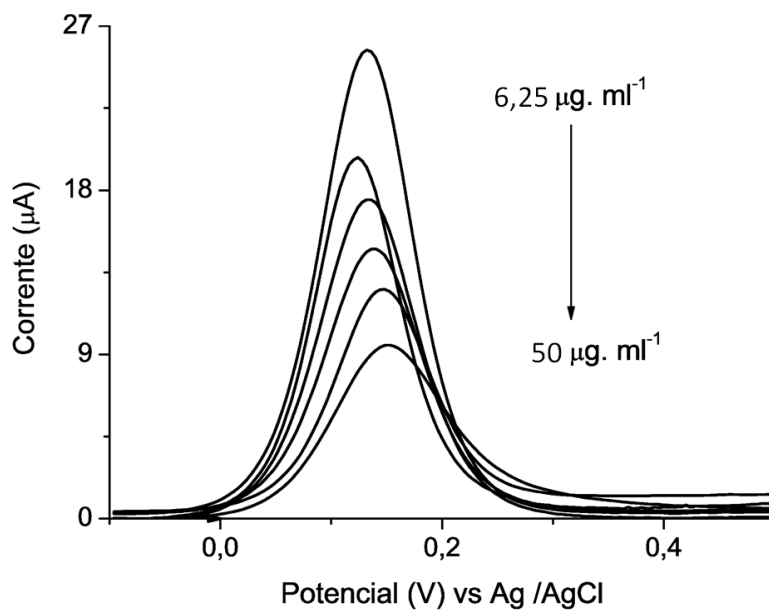


Figura 4.4. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo *screen-printed* modificado com anti-PCR ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) incubado com concentrações diferentes de PCR, usando o de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como indicador eletroquímico.

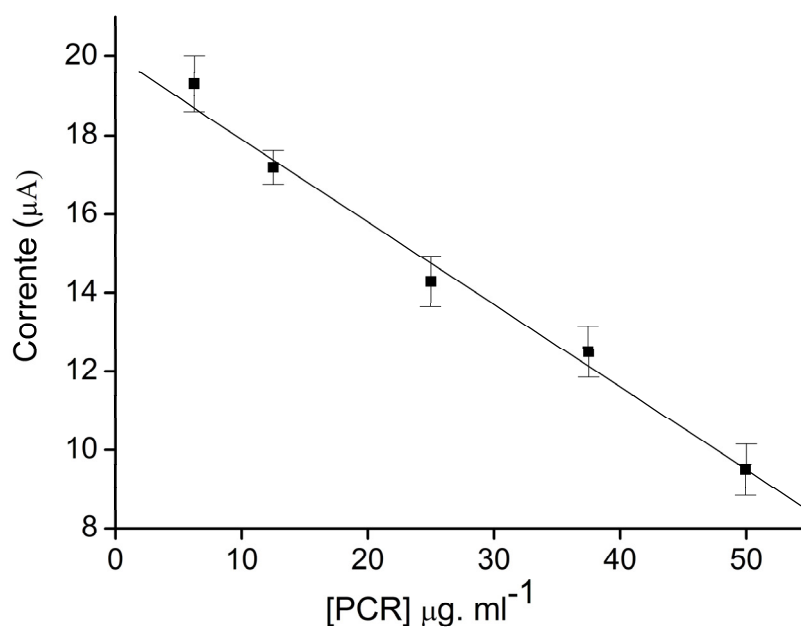


Figura 4.5. Curva de calibração obtida a partir do sinal do ferrocianeto de potássio após interação antígeno-anticorpo.

Com o aumento do material adsorvido na superfície do eletrodo *screen-printed* DRP 220 AT modificado como anti-PCR, ocorre um decréscimo na transferência eletrônica para o

eletrodo, sugerindo o depósito de material sobre a superfície a partir da interação antígeno-anticorpo.

A partir da sequência de aminoácidos da proteína C reativa obtida no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Figura 4.6), realizou-se o cálculo do ponto isoeletrico (pI) teórico da PCR no *Expasy Bioinformatics Resource Portal*, resultando em 5.45.

10	20	30	40	50
MEKLLCFLVL	TSLSHAFGQT	DMSRKAFVFP	KESDTSYVSL	KAPLTKPLKA
60	70	80	90	100
FTVCLHFYTE	LSSTRGYSIF	SYATKRQDNE	ILIFWSKDIG	YSFTVGGSEI
110	120	130	140	150
LFEVPEVTVA	PVHICTSWES	ASGIVEFWVD	GKPRVRKSLK	KGYTVGAEAS
160	170	180	190	200
IILGQEQDSF	GGNFEGSQSL	VGDIGNVNMW	DFVLPDEIN	TIYLGPFSP
210	220			
NVLNWRALKY	EVQGEVFTKP	QLWP		

Figura 4.6. Sequência de aminoácidos da proteína C reativa.

Tendo em vista que valores de pH abaixo do pI resultam em carga líquida positiva e valores de pH acima do pI resultam em carga líquida negativa, considerando-se as condições dos testes realizados, com amostras de soro humano que possuem pH igual a 7,4, pode-se dizer que a carga líquida da proteína é negativa, o que faz com que haja um decréscimo na transferência eletrônica para o indicador redox, sugerindo que quanto maior for a concentração da proteína capturada sobre a plataforma eletrodo *screen-printed*/anti-PCR, menor será a transferência eletrônica, ou seja, as respostas de corrente diminuem de forma gradativa com o incremento na concentração do analito alvo (PCR).

Outro fator que pode estar associado a queda na resposta de corrente em relação a incrementos na concentração do alvo (soro positivo) pode ser atribuído a uma dificuldade de transferência eletrônica do alvo (proteína C reativa) para o indicador redox, pois é possível que, após a ligação do antígeno (PCR) ao imunossensor (ouro/anti-PCR), a molécula de PCR (alvo) sofra uma alteração conformacional e, após esta interação, ocorra uma exposição da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos básicos (ácido aspártico e ácido glutâmico), presentes em sua estrutura. Como estes resíduos de aminoácidos possuem carga negativa em pH 7,4, poderão repelir o íon de ferrocianeto, reduzindo a corrente de oxidação.

A determinação do limite de detecção e do limite de quantificação encontra-se descrita a seguir:

Cálculo do limite de detecção (LD):

$$LD = \frac{3 \times \text{desvio padrão do branco}^*}{\text{coeficiente angular da reta}}$$

* eletrodo limpo/anti-PCR/BSA

Cálculo do limite de quantificação (LQ):

$$LQ = \frac{10 \times \text{desvio padrão do branco}}{\text{coeficiente angular da reta}}$$

A faixa linear de resposta foi $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o limite de detecção foi $0,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e o limite de quantificação foi $2,59 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ($r = 0,994$, $n = 5$). Sendo assim, observa-se que o sistema é sensível e eficiente na quantificação do analito de interesse.

4.3.3 Detecção de proteína C reativa em soro humano

4.3.3.1 Voltamograma de pulso diferencial

Para determinar a seletividade do sistema, testes utilizando fuidos biológicos foram realizados. No soro humano existem vários componentes que podem interferir na leitura do sinal e sensibilidade do imunossensor. A resposta do imunossensor foi avaliada e mostrada na Figura 4.7.

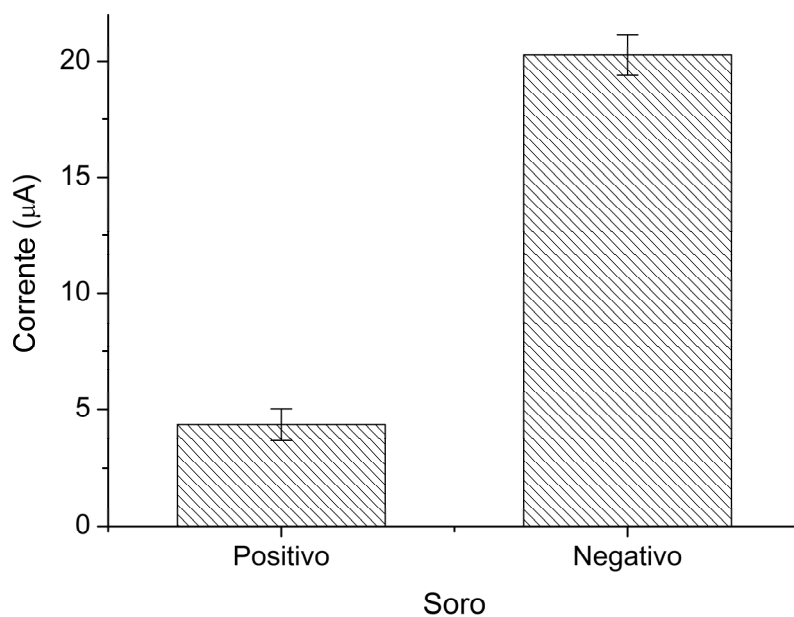


Figura 4.7. Gráfico de barras utilizando o sinal de oxidação a partir do ferrocianeto de potássio. Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados nas seguintes condições: solução eletrolítica de ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$, 5 mmol.L⁻¹) e cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol.L⁻¹), Amplitude de modulação: 25 mV. Pulso Intervalo: 0,2 s; 20 mV s⁻¹.

4.3.3.2 Ressonância de plasma de superfície

Os resultados obtidos nos testes com SPR apresentados nas Figuras 4.8 e 4.9 demonstram que houve discriminação angular entre os soros positivo e negativo.

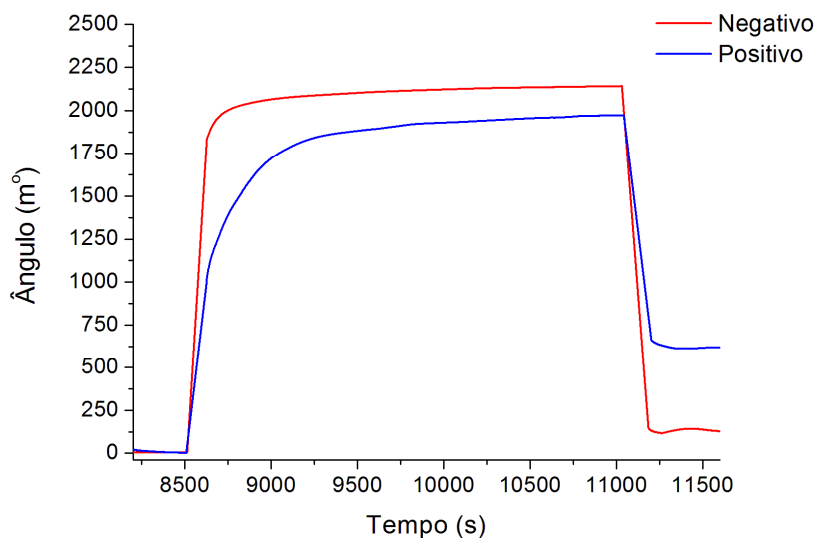


Figura 4.8. Discriminação angular entre os soros positivo e negativo para proteína C reativa.

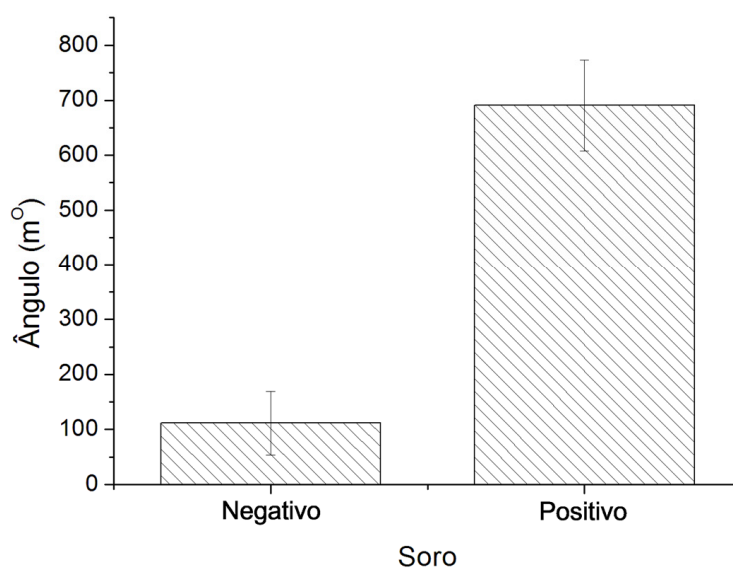


Figura 4.9. Média e desvio padrão da triplicata realizada com soro humano positivo e negativo para proteína C reativa.

Para validar o sistema, testes em triplicatas foram realizados para cada tipo de soro: positivo e negativo.

A média e o desvio padrão dos valores angulares dos soros testados foram: $690,59 \pm 82,92 m^\circ$ para pacientes acometidos por IAM (soro positivo para PCR) e $111,55 \pm 58,06 m^\circ$ para pacientes sem alterações relacionadas à síndrome coronária (soro negativo para PCR).

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

4.3.3.3 Microscopia de força atômica

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram utilizadas para análise da superfície do eletrodo de ouro sem biomolécula, após imobilização do anticorpo e após incubação do alvo complementar (PCR) (Figura 4.10).

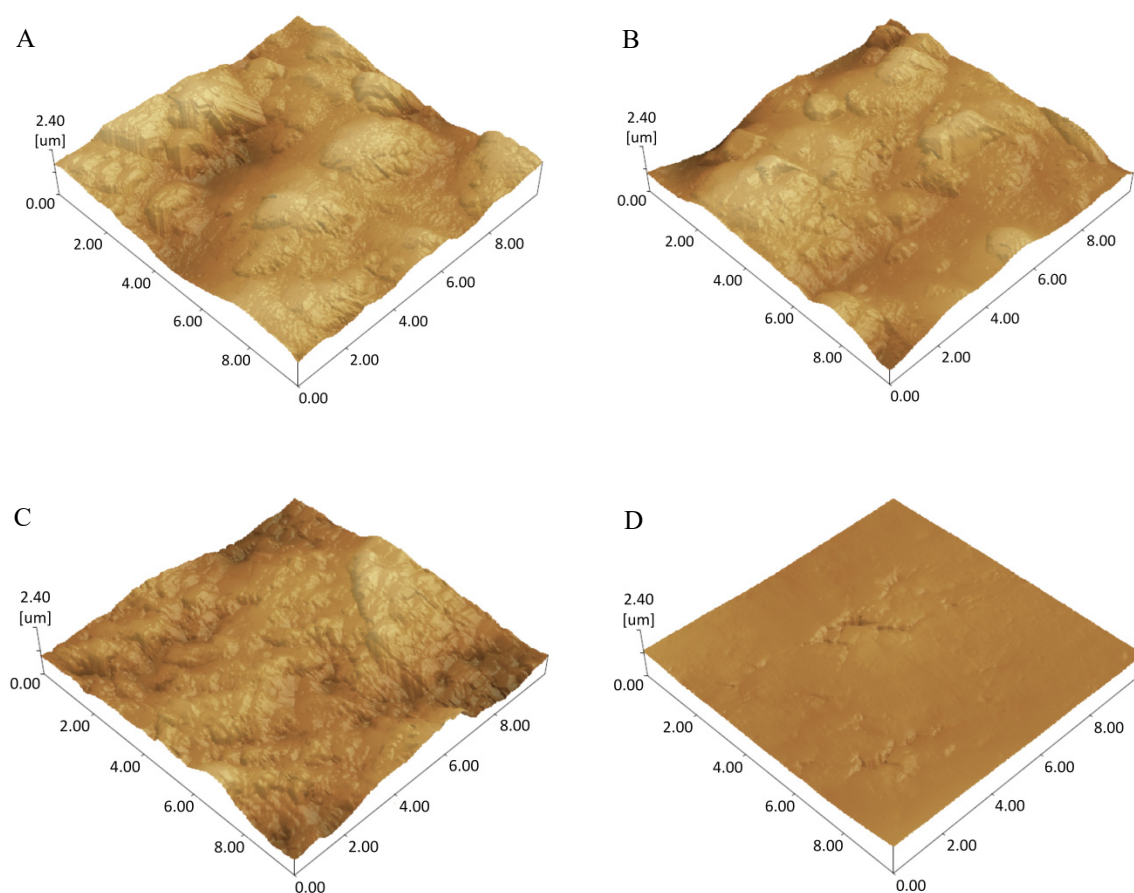


Figura 4.10. Microscopia de forma atômica. A: Eletrodo de ouro sem biomolécula; B: Eletrodo de ouro com anti-PCR; C: Sonda com soro humano negativo; D: Sonda com soro humano positivo.

Os valores obtidos na AFM foram: $270 \pm 3,55$ nm (rugosidade do eletrodo de ouro), $287 \pm 1,11$ nm (rugosidade do eletrodo de ouro com imobilização da anti-PCR), $273,51 \pm 0,44$ nm (rugosidade do sensor com soro humano negativo), $51,98 \pm 0,31$ nm (rugosidade do sensor com soro humano positivo).

Como mostrado na Figura 4.8, o eletrodo de ouro após imobilização do anticorpo (Figura 4.8B) possui maior rugosidade que o eletrodo de ouro sem biomoléculas (Figura 4.8A), indicando que o anticorpo foi incorporado com eficácia na superfície do eletrodo. Já a superfície com incubação do soro negativo (Figura 4.8C) apresenta aumento da rugosidade quando comparada à figura 4.8A, pois no soro negativo há pequena quantidade de PCR. As alterações na superfície com incubação do alvo complementar (antígeno - soro humano positivo) (Figura 4.8D) demonstram que houve redução da rugosidade em relação à figura 4.8B devido à interação do anticorpo e da proteína C reativa, pois a PCR é uma proteína globular pentamérica com 25106 Da, dessa forma a superfície torna-se mais homogênea.

4.3.3.4 Impedância

A ligação do anticorpo/antígeno pode ser detectada por espectroscopia de impedância eletroquímica. As Figuras 4.11 e 4.12 apresentam diagramas de Nyquist, os quais representam as respostas de impedância do eletrodo de ouro *screen printed* descoberto e dos eletrodos de ouro/anti-PCR na ausência ou na presença do soro negativo e positivo.

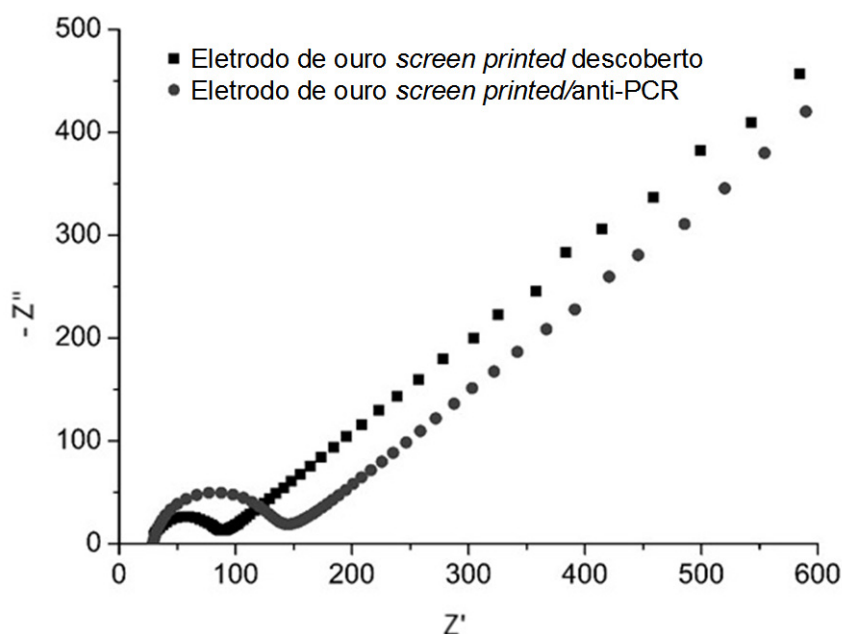


Figura 4.11. Diagrama de Nyquist para a espectroscopia de impedância eletroquímica em $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de solução de KCl. Os testes foram realizados para um eletrodo de ouro *screen printed* descoberto e para um eletrodo de ouro *screen printed*/anti-PCR. $E_{\text{ap}} = +0,12 \text{ V}$; amplitude = 10 mV ; faixa de frequência = 100 kHz a 10 Hz .

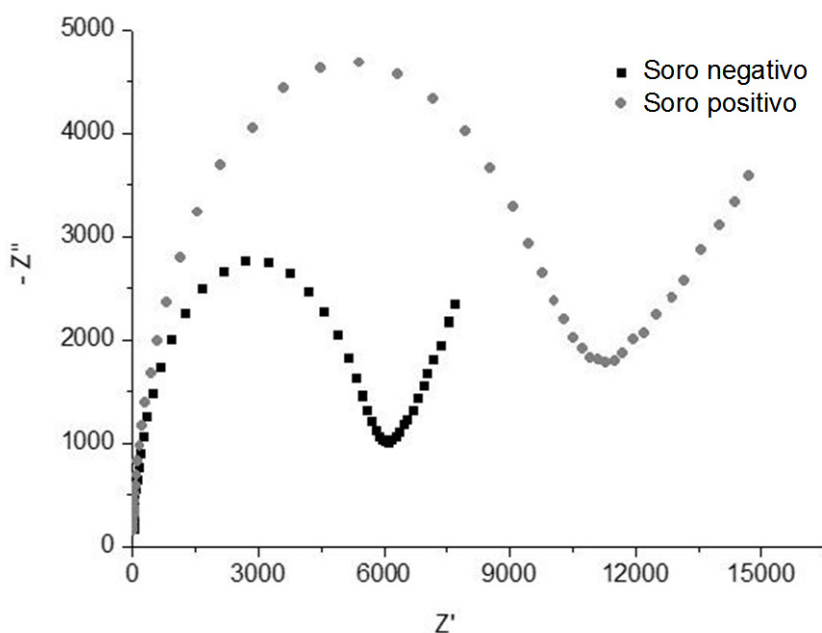


Figura 4.12. Diagrama de Nyquist para espectroscopia de impedância eletroquímica em $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ contendo $0,1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ de KCl. Os testes foram realizados para um eletrodo de ouro/ anti-PCR/soro negativo e ouro/anti-PCR/soro positivo. $E_{\text{ap}} = +0,12 \text{ V}$; amplitude = 10 mV ; faixa de frequência = 100 kHz a 10 Hz .

A Figura 4.13 apresenta o circuito equivalente obtido.

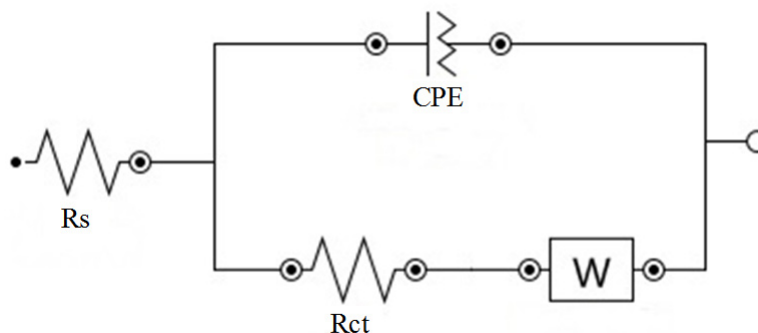


Figura 4.13. Circuito elétrico equivalente. R_s : resistência da solução; R_{ct} : resistência a transferência de carga; CPE: elemento de fase constante; W: impedância Warburg.

A Tabela 4.1 representa os valores da montagem dos elementos do circuito equivalente, onde Q é a capacitância, o símbolo n representa o deslocamento do ângulo de fase, W é a impedância Warburg e R_{ct} é a resistência a transferência de carga. Os valores de qui-quadrado (χ^2) de Kronig- Kramers são da ordem de 10^{-5} a 10^{-6} , indicando um bom ajuste do circuito equivalente apresentado e comprovam a credibilidade dos resultados indicados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Valores dos elementos do circuito equivalente.

	Eletrodo de ouro descoberto	Eletrodo de ouro/anti-PCR	Eletrodo de ouro/anti-PCR/soro negativo	Eletrodo de ouro/anti-PCR/soro positivo
$R_s (\Omega)$	27,4650	29,7170	30,2760	30,4632
$Q (\mu F)$	2,3509	1,6894	1,8905	1,83160
n	0,9985	0,9992	0,9987	0,9981
$R_{ct} (\Omega)$	60,5170	107,650	5844,60	10809,0
$W (mMho)$	4,93	4,70	0,897	0,521
$\chi^2 (Z)$	$7,1664 \times 10^{-6}$	$1,5413 \times 10^{-5}$	$2,1896 \times 10^{-5}$	$4,0433 \times 10^{-5}$

O eletrodo de ouro/anti-PCR (107,650 Ω), em comparação com o eletrodo de ouro descoberto (60,517 Ω), demonstra um aumento da resistência à transferência de carga (R_{ct}). A presença de anticorpo dificulta a R_{ct} de reações do par redox ferricianeto/ferrocianeto de potássio na superfície do eletrodo.

Os testes com o eletrodo de ouro/anti-PCR na presença dos soros negativo e positivo demonstraram que o soro positivo (10.809,0 Ω) aumenta a R_{ct} em comparação com o soro negativo (5.844,6 Ω).

A interação específica entre o anticorpo (anti-PCR) e o antígeno (soro positivo) proporcionou um aumento da R_{ct} , visto que a reação entre anticorpo e antígeno resulta na formação de um produto menos solúvel.

4.4 Conclusão

Tendo em vista a importância de diagnóstico precoce da síndrome coronária aguda, observa-se a importância do desenvolvimento e validação de imunossensores 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.

Os imunossensores desenvolvidos para detecção de proteína C reativa com utilização de voltametria de pulso diferencial e ressonância de plasma de superfície demonstraram eficácia e potencial utilização como auxílio diagnóstico e monitoramento da evolução de situações clínicas associadas a cardiopatias.

Portanto, a implementação de biossensores como auxílio diagnóstico da síndrome coronariana 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.

CAPÍTULO 5

5 DESENVOLVIMENTO DE IMUNOSSENSOR PARA DETECÇÃO DE TROPONINA T

5.1 Introdução

Esse capítulo apresenta o desenvolvimento de um imunossensor baseado na interação do anticorpo anti-troponina T e antígeno troponina T, a partir da utilização de eletrodos impressos de grafite como plataforma e solução de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L⁻¹) e cloreto de potássio (KCl, 0,1 mol.L⁻¹) como mediador eletroquímico.

O objetivo dessa pesquisa consiste no desenvolvimento de um biossensor para detecção de troponina T, devido à sua importância como marcador molecular de lesão miocárdica. Sendo assim, serão apresentados os testes realizados com soros de pacientes positivos e negativos para troponina T, com a finalidade de desenvolver um imunossensor a partir da interação antígeno-anticorpo para detecção e discriminação desta molécula.

O imunossensor foi desenvolvido sobre a superfície do eletrodo de grafite e avaliado por voltametria de pulso diferencial.

5.2 Experimentos

5.2.1 Materiais

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico sem purificação anterior. Água ultra pura (Master System, Gehaka, Brasil) foi utilizada para a preparação de todas as soluções. Anti troponina T (anticorpo) foi adquirida da Sigma-Aldrich (EUA). As soluções de anticorpo e antígeno foram preparadas em tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ (Na₂HPO₄ 0,061 mol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0,039 mol.L⁻¹, pH 7,3). O soro humano foi obtido no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

A detecção da troponina T foi realizada em ferrocianeto de potássio: K₄Fe(CN)₆.3H₂O (5 mmol.L⁻¹) em cloreto de potássio: KCl (0,10 mol.L⁻¹).

Os eletrodos de grafite *screen printed* DS110 foram adquiridos da Drop Sens. A solução de bloqueio utilizada foi a albumina sérica bovina (BSA) 0,5%.

5.2.2 Equipamentos

Os testes eletroquímicos foram realizados em um potenciostato da CH Instruments, modelo 760C. Foram utilizados eletrodos de grafite *screen printed* DRP-110 (Drop Sens), os quais são compostos por um eletrodo de trabalho feito de uma tinta de grafite com diâmetro de 4 mm, um eletrodo referência que contém tinta condutora de prata e o contra-eletrodo produzido a partir de uma tinta de grafite, o eletrodo foi impresso em uma superfície de cerâmica.

Avaliou-se a morfologia do eletrodo na ausência ou na presença de biomoléculas por microscopia de força atômica (AFM) (Shimadzu SPM 9600, *tapping mode*).

5.2.3 Coleta de soro humano e quantificação da troponina T

As coletas de soro dos pacientes foram realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da UFU, número do parecer 721.990.

A quantificação da troponina T foi realizada por eletroquimioluminescência para pacientes acometidos por infarto do miocárdio e para pacientes sem alterações relacionadas à

síndrome coronária aguda, os quais apresentaram concentrações de troponina abaixo de 0,014 ng.mL⁻¹.

5.2.4 Imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de grafite *screen printed*

Realizou-se uma avaliação sobre a superfície do eletrodo de grafite *screen-printed* DS110 em solução de ácido sulfúrico (0,5 mol.L⁻¹, pH 0,4) para verificar a qualidade do eletrodo, que é indispensável para o processo de desenvolvimento de um imunossensor. Utilizou-se a técnica de voltametria cíclica, foram aplicados 2 ciclos numa faixa de potencial de +0,20 V a +1,20 V com velocidade de varredura 50 mV.s⁻¹.

Utilizou-se anticorpo (anti-troponina T, 4 µL, 10 ng.mL⁻¹) e antígeno (soro de pacientes acometidos por infarto do miocárdio, 4 µL). Os processos de imobilização do anticorpo e interação antígeno-anticorpo foram realizados a 26°C por 30 minutos. Utilizou-se solução de albumina sérica bovina (BSA) para bloquear a superfície durante 30 minutos a 12°C e as lavagens foram realizadas com tampão fosfato entre as fases de imobilização, bloqueio da superfície e adição do antígeno. Foram realizados testes com soros positivo e negativo para troponina T (Figura 5.1).

Para os testes de voltametria de pulso diferencial foi utilizada a solução de K₄Fe(CN)₆.3H₂O (5 mmol.L⁻¹) em KCl (0,10 mol.L⁻¹) como solução eletrolítica.

A partir da sequência de aminoácidos da troponina T obtida no *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) (Figura 5.2), realizou-se o cálculo do ponto isoelétrico (pI) teórico da troponina T no *Expasy Bioinformatics Resource Portal*, resultando em 4,94.

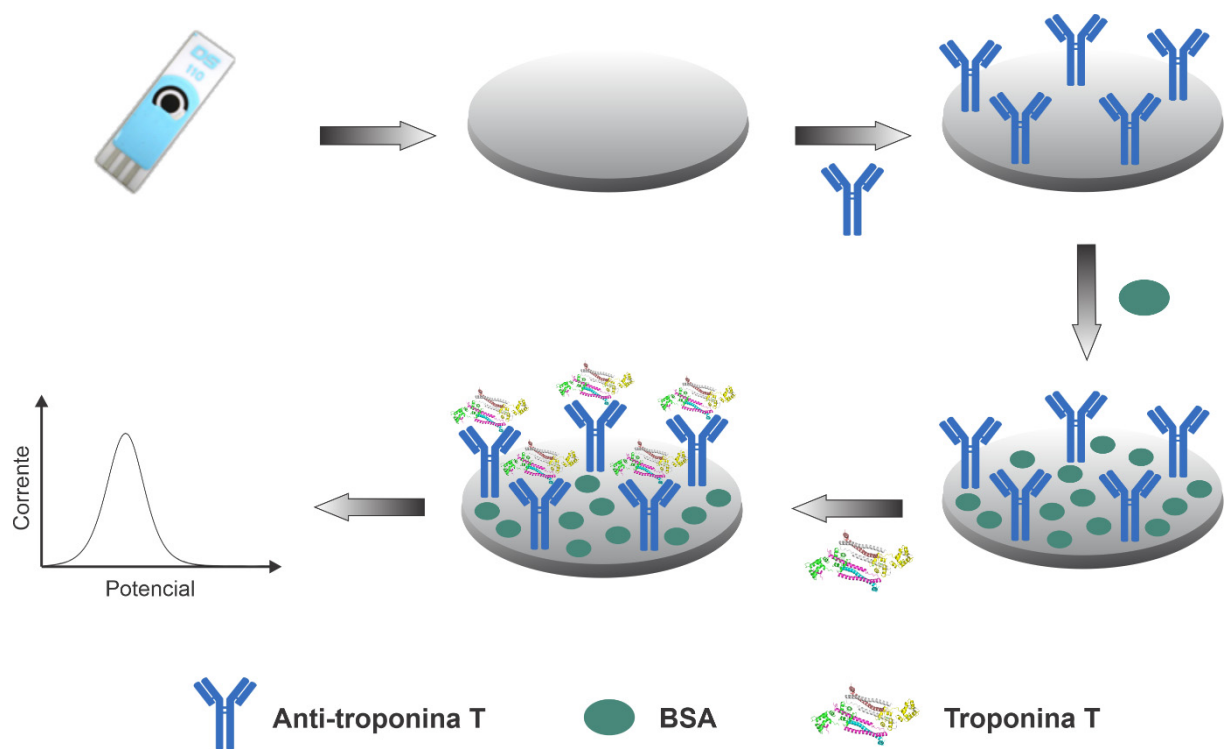


Figura 5.1. Esquema do imunossensor desenvolvido com a utilização de eletrodos de grafite screen printed

10	20	30	40	50
MSDIEEVVEE	YEEEEQEEAA	VEEEEDWRED	EDEQEEAAEE	DAEAEAETEE
60	70	80	90	100
TRAEEDEEEE	EAKEAEDGPM	EESKPKPRSF	MPNLVPPKIP	DGERVDFDDI
110	120	130	140	150
HRKRMEKDLN	ELQALIEAHF	ENRKKEEEEL	VSLKDRIERR	RAERAEQQRI
160	170	180	190	200
RNEREKERQN	RLAEERARRE	EEENRRKAED	EARKKKALS	NMMHFGGYIQK
210	220	230	240	250
QAQTERKSGK	RQTEREKKKK	ILAERRKVLA	IDHLNEDQLR	EKAKELWQSI
260	270	280	290	
YNLEAEKFDL	QEKFKQQKYE	INVLRNRIND	NQKVSKTRGK	AKVTGRWK

Figura 5.2. Sequência de aminoácidos da troponina T.

5.2.5 Curva de calibração

A análise da eficiência dos imunossensores foi testada com soro humano, sendo que diferentes concentrações de antígeno foram utilizadas para a definição da curva de calibração (1 ng.mL⁻¹, 2 ng.mL⁻¹, 3 ng.mL⁻¹, 4 ng.mL⁻¹ e 5 ng.mL⁻¹). O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Curva de calibração eletroquímica

Construiu-se uma curva de calibração a partir da análise dos voltamogramas de oxidação do ferrocianeto de potássio. Para o desenvolvimento do imunossensor, manteve-se a concentração do anticorpo específico: anti-troponina T (10 ng.mL^{-1}) e variou-se as concentrações do antígeno: troponina T (1 ng.mL^{-1} , 2 ng.mL^{-1} , 3 ng.mL^{-1} , 4 ng.mL^{-1} e 5 ng.mL^{-1}), conforme pode-se observar nas Figuras 5.3 e 5.4.

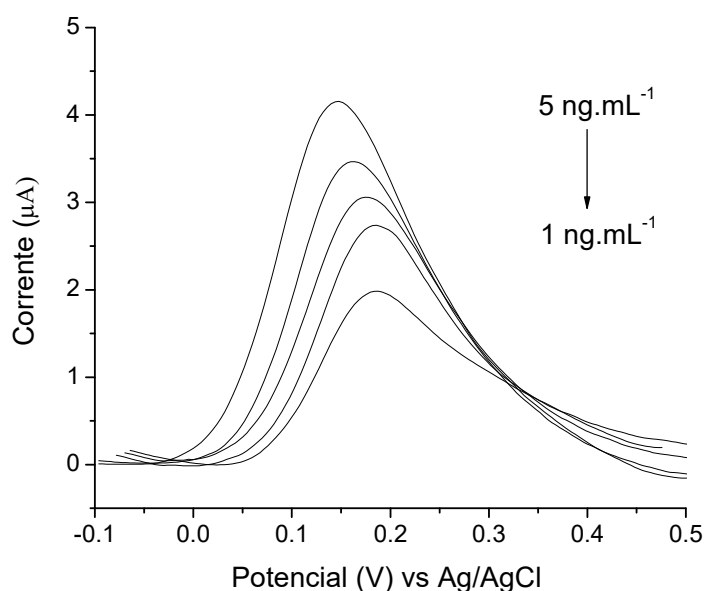


Figura 5.3. Voltamogramas de pulso diferencial do eletrodo *screen-printed* modificado com anti-troponina T (10 ng.mL^{-1}) incubado com concentrações diferentes de troponina T, usando o ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$) como indicador eletroquímico.

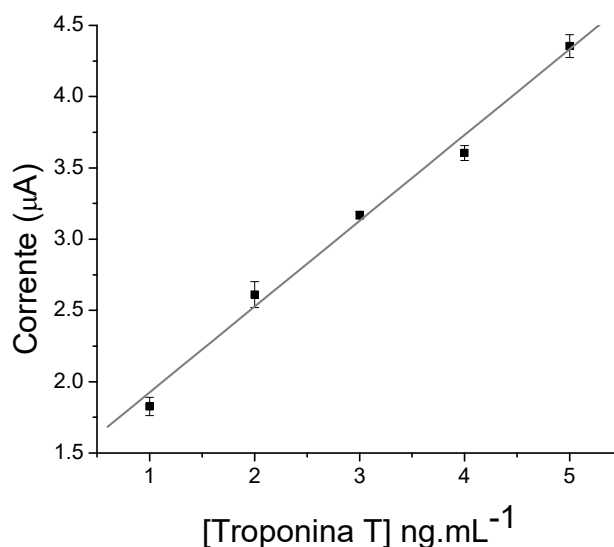


Figura 5.4. Curva de calibração obtida a partir do sinal do ferrocianeto de potássio após interação antígeno-anticorpo.

Observou-se um aumento de resposta de corrente com o incremento na concentração do alvo (soro positivo). Esse aumento de resposta pode ser atribuído a um favorecimento de transferência eletrônica do alvo (troponina T) para o indicador redox, pois é possível que, após a ligação do antígeno (troponina T) ao imunossensor (eletrodo *screen-printed*/anti-troponina T), a molécula de troponina T (alvo) sofra uma alteração conformacional e, após esta interação, ocorra uma exposição da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos básicos (lisina, arginina e histidina) presentes em sua estrutura. Como estes resíduos de aminoácidos possuem carga positiva em pH 7,4, ocorre uma aproximação do indicador (ferrocianeto/ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{2-}$) para a superfície do transdutor, aumentando a corrente de oxidação.

O imunossensor apresentou boa sensibilidade, limite de detecção e limite de quantificação, indicados a seguir:

Cálculo do limite de detecção (LD):

$$\text{LD} = \frac{3 \times \text{desvio padrão do branco}^*}{\text{coeficiente angular da reta}}$$

* eletrodo limpo/anti-troponina T/BSA

Cálculo do limite de quantificação (LQ):

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \text{desvio padrão do branco}}{\text{coeficiente angular da reta}}$$

Os limites de detecção e quantificação foram $0,0117 \text{ ng.mL}^{-1}$ e $0,0389 \text{ ng.mL}^{-1}$, respectivamente, para uma faixa linear de resposta foi $0,01 \text{ ng.mL}^{-1}$ a 5 ng.mL^{-1} ($r = 0.993$, $n=5$). A sensibilidade apresentada foi $0,6 \mu\text{A/ng.mL}^{-1}$. Sendo assim, observa-se que o sistema é sensível e eficiente na quantificação do analito de interesse.

5.3.2 Detecção de troponina T em soro humano

5.3.2.1 Voltamograma de pulso diferencial

Para determinar a seletividade do sistema, testes usando fluidos biológicos foram realizados. No soro humano existem componentes que podem interferir na leitura do sinal e sensibilidade do imunossensor. A resposta do imunossensor foi avaliada e mostrada na Figura 5.5.

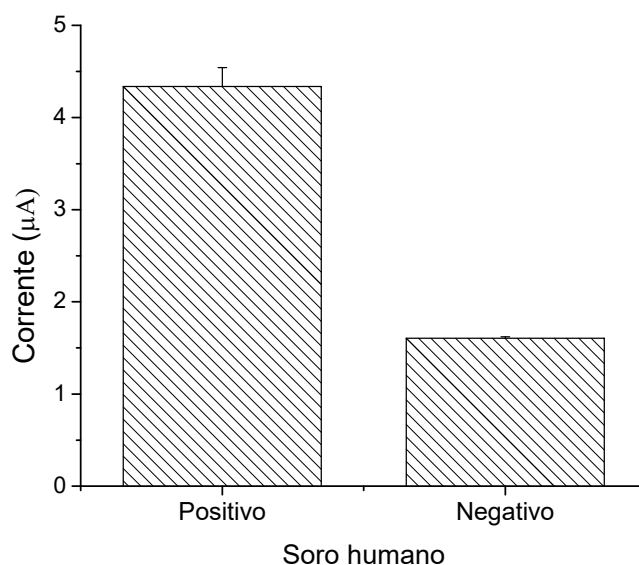


Figura 5.5. Gráfico de barras utilizando o sinal de oxidação a partir do ferrocianeto de potássio. Os voltamogramas de pulso diferencial foram realizados nas seguintes condições: solução eletrolítica de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol.L^{-1}) e cloreto de potássio (KCl , $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), Amplitude de modulação: 25 mV . Pulso Intervalo: $0,2 \text{ s}$; 20 mV s^{-1} .

5.3.2.2 Microscopia de força atômica

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram utilizadas para análise da superfície do eletrodo de grafite sem biomolécula, após imobilização do anticorpo e após incubação do alvo complementar (troponina T) (Figura 5.6).

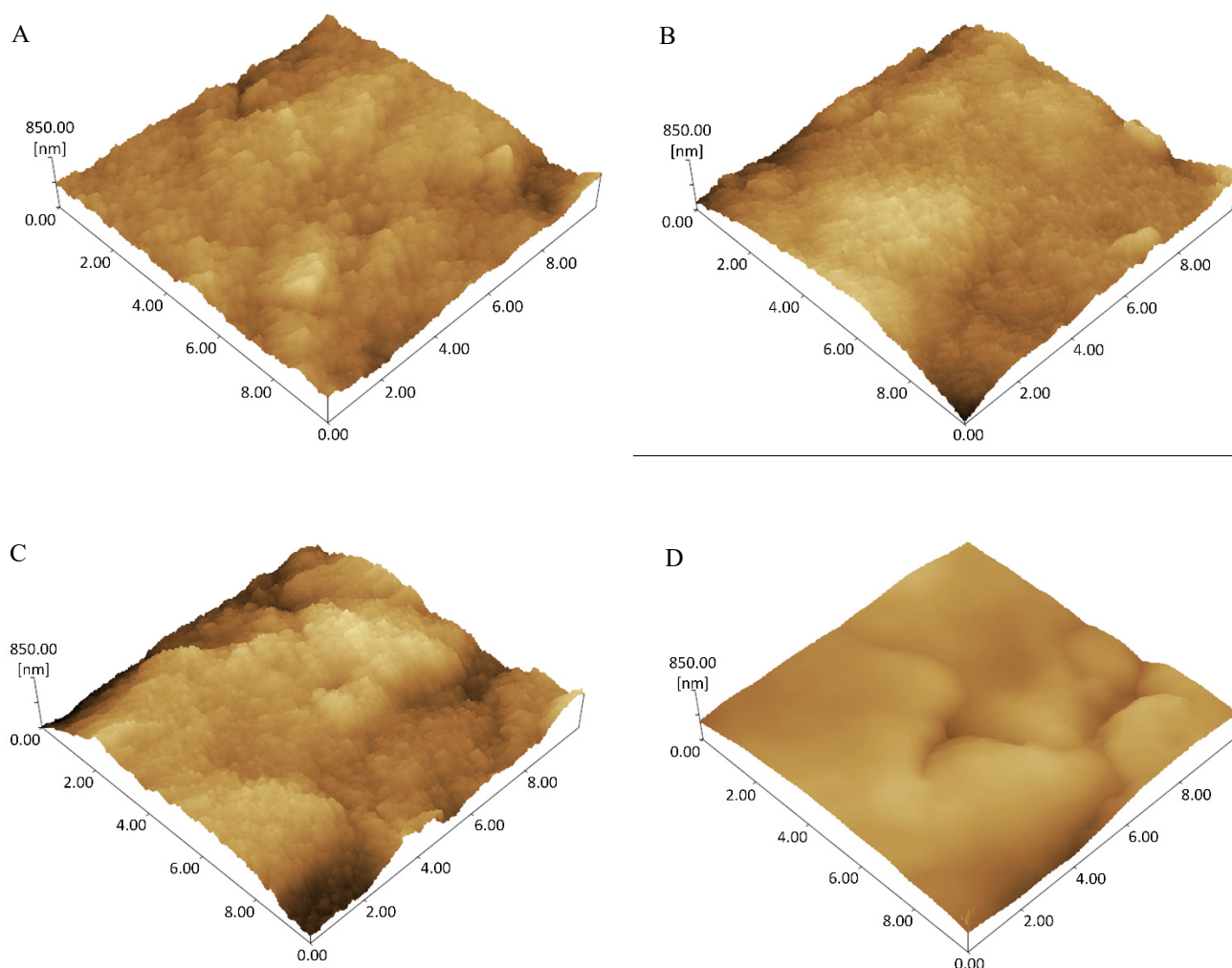


Figura 5.6. Microscopia de forma atômica. A: Eletrodo de grafite sem biomolécula; B: Eletrodo de grafite com anti-troponina T; C: Sonda com soro humano negativo; D: Sonda com soro humano positivo.

Os valores de rugosidade obtidos foram: $71,513 \pm 0,129$ nm (eletrodo de grafite), $91,839 \pm 0,282$ nm (eletrodo de grafite/anti-troponina T), $126,871 \pm 0,365$ nm (grafite/anti-troponinaT/soro negativo), $64,333 \pm 0,295$ nm (grafite/anti-troponinaT/soro positivo).

Como mostrado na Figura 5.5, o eletrodo de grafite, após imobilização do anticorpo, (Figura 5.5B) possui maior rugosidade que o eletrodo de grafite sem biomolécula sonda (Figura 5.5A) indicando que o anticorpo foi incorporado sobre a superfície do eletrodo.

A topografia da superfície do eletrodo de grafite/anti-troponina T é comparável a superfície grafite/anti-troponinaT/soro negativo e diferencia-se consideravelmente da superfície grafite/anti-troponinaT/soro positivo, indicando que o sensor discrimina soro positivo e negativo, em concordância com os estudos eletroquímicos (Figura 5.4).

O imunossensor/soro negativo (Figura 5.5C) apresenta aumento da rugosidade quando comparada ao eletrodo de grafite descoberto (5.5A) e imunossensor (5.5B), pois no soro negativo há pequena quantidade de troponina T. As alterações na superfície com incubação do alvo complementar (antígeno - soro humano positivo) (Figura 5.5D) demonstram que houve redução da rugosidade em relação à Figura 5.5C, devido à interação do anticorpo e do antígeno (soro de paciente acometido por infarto do miocárdio), pois a troponina T é uma proteína globular de alto peso molecular, 70.000 Da, podendo cobrir os vales da superfície, conferindo um aspecto mais homogêneo a esta superfície.

5.4 Conclusão

O desenvolvimento do biossensor para detecção de troponina T para aplicação clínica contribui para o avanço científico e tecnológico na área de cardiologia, com destaque para a possibilidade de obtenção de novo dispositivo para auxílio diagnóstico.

O imunossensor desenvolvido para detecção de troponina T, com utilização do eletrodo *screen printed* de grafite e detecção dos picos de oxidação por meio de voltametria de pulso diferencial, demonstrou eficácia e potencial utilização como auxílio diagnóstico do infarto do miocárdio.

A partir da microscopia de força atômica, foi possível observar a modificação da morfologia da superfície dos eletrodos e dos valores de rugosidade, sendo possível distinguir os soros de pacientes positivos e negativos.

Biossensores, para detecção de interações moleculares, possibilitam a quantificação de biomoléculas em tempo real, de forma específica e seletiva. Sendo assim, o desenvolvimento e utilização de biossensores apresentam importantes avanços científicos e tecnológicos, os quais incluem realização de diagnósticos mais rápidos e melhor prognóstico dos pacientes acometidos por infarto do miocárdio.

CAPÍTULO 6

6 DESENVOLVIMENTO DE UM *SOFTWARE* PARA DIGITALIZAÇÃO ELETROCARDIOGRÁFICA

6.1 Introdução

O eletrocardiograma (ECG) é um dos exames complementares de maior capacidade informativa, utilizado no diagnóstico, na avaliação e no planejamento terapêutico de praticamente todas as doenças cardiovasculares (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003; CLIFFORD, 2006; RAWLINGS, 1991). Juntamente ao exame clínico, é extremamente útil para detectar cardiopatias (CLEMMENSEN *et al.*, 1991). Na maioria dos casos de infarto agudo do miocárdio, por exemplo, ainda que a análise clínica, a partir da detecção de precordialgia, e os exames laboratoriais sejam suficientes para suspeitar ou permitir o diagnóstico, este pode ser confirmado pelo ECG que, além disso, fornece importantes informações quanto a localização e evolução do processo isquêmico (BRAUNWALD, ZIPES, LIBBY, 2003).

Tendo em vista a ampla utilização e importância deste exame na prática clínica, observa-se a importância da realização de análises eletrocardiográficas quantitativas, desenvolvimento de escores clínicos com base nas características das ondas, segmentos e intervalos do sinal eletrocardiográfico, além da modelagem e processamento dos dados, para que exista uma análise mais satisfatória, diagnóstico preciso e melhor prognóstico das patologias.

Visto que na maioria dos hospitais, clínicas de cardiologia e unidades de dor torácica vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS), o registro eletrocardiográfico é realizado com eletrocardiógrafos analógicos e obtenção de registros impressos, observou-se a necessidade da

obtenção de um método para a digitalização destes exames, tornando possível o processamento e análise dos sinais digitalizados.

Diversas bases de dados utilizadas em pesquisas, principalmente em estudos retrospectivos, são constituídas de eletrocardiogramas impressos. Esses exames ocupam grande espaço físico, estão sujeitos a danos, como a perda do sinal eletrocardiográfico impresso e não podem ser analisados e processados. Portanto, uma forma de minimizar este problema é converter os eletrocardiogramas impressos em sinais eletrocardiográficos digitais, assim é possível armazená-los de forma eficaz e realizar o processamento e a análise dos sinais (BADILINI *et al.*, 2005).

Considerando o alto custo para aquisição de métodos de digitalização de eletrocardiogramas impressos já existentes (MITRA, MITRA, CHAUDHURI, 2004; BADILINI *et al.*, 2005) e utilizados por hospitais e grupos de pesquisas, detectou-se a importância do desenvolvimento de um *software* com esta finalidade.

Portanto, este capítulo apresenta o desenvolvimento e as aplicações clínicas do ECGLab, um software que foi desenvolvido para conversão de eletrocardiogramas impressos em ECGs digitais, devido à importância de pesquisas clínicas e de processamento dos sinais biomédicos (DEURSEN *et al.*, 2014; GREGG *et al.*, 2012; INFUSINO *et al.*, 2014; MITRA, MITRA, CHAUDHURI, 2004). A avaliação clínica da ferramenta implementada foi realizada com base na duração da onda P, duração do intervalo QRS e duração da onda T.

6.2 Materiais e Métodos

O programa ECGLab foi desenvolvido com as ferramentas de interfaces do Matlab, versão 7.8.0.347 (R2009a).

A coleta de dados foi realizada no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). A pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética da UFU, número do parecer 474.928. Após a coleta dos registros eletrocardiográficos, os exames foram escaneados por meio do Scanner HP Photosmart. A partir das imagens dos exames, em formato .png, realizou-se a digitalização dos mesmos.

Os eletrocardiogramas impressos devem ser primeiramente convertidos em imagens digitais, para a posterior manipulação no programa desenvolvido. A interface pode ser visualizada na Figura 6.1.

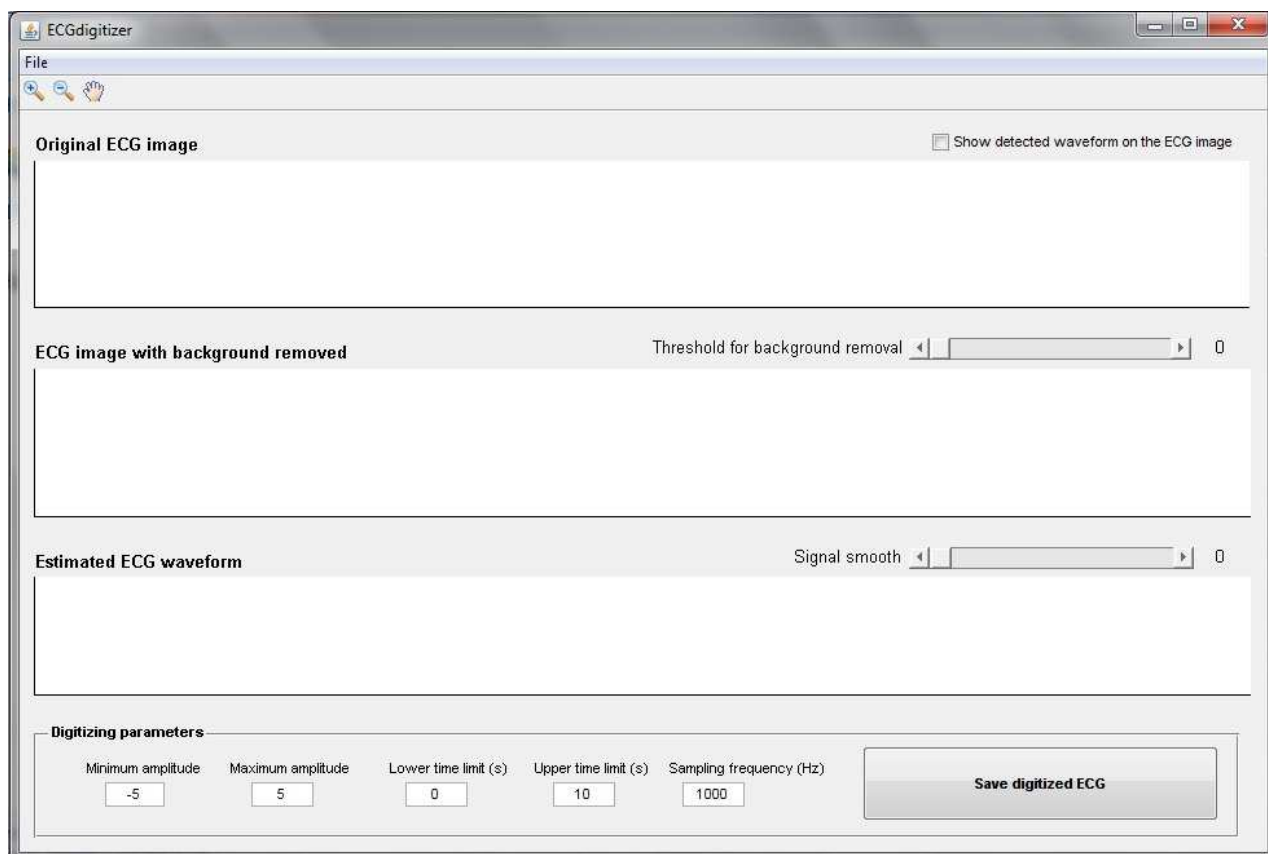


Figura 6.1. Interface do usuário desenvolvida para a digilitização de sinais eletrocardiográficos.

Para acessar o exame desejado, é necessário primeiramente clicar em “file”, logo após em “open” e selecionar a pasta onde estão armazenados os ECGs.

O eletrocardiograma contém 12 derivações (6 periféricas e 6 precordiais).

As derivações periféricas registram a diferença de potencial entre os membros (bipolares) ou entre certas partes do corpo e o coração (unipolares). Coloca-se um eletrodo em cada braço (direito e esquerdo) e um na perna esquerda, formando o triângulo de Einthoven (PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006; RAWLINGS, 1991).

Derivações bipolares: DI (registra a diferença de potencial entre o braço esquerdo e braço direito, é obtida colocando-se o eletrodo (+) no braço esquerdo e o eletrodo (-) no braço direito), DII (registra a diferença de potencial entre a perna esquerda e o braço direito, o eletrodo (+) é colocado na perna esquerda e o (-) no braço direito) e DIII (registra a diferença de potencial entre a perna esquerda e o braço esquerdo, o eletrodo (+) é conectado à perna esquerda e o (-) ao braço esquerdo) (RAWLINGS, 1991).

Derivações unipolares (dos membros): derivações aVR, aVL e aVF, os eletrodos negativos se dirigem para um fio comum (referência), localizado no pé direito; aVR (braço

direito positivo), aVL (braço esquerdo positivo) e aVF (pé esquerdo positivo) (CLEMMENSEN, 1991).

Derivações precordiais ou torácicas (plano horizontal): são as derivações V1, V2, V3, V4, V5 e V6. V1 (eletrodo localizado no 4º espaço intercostal (EIC) a direita do esterno), V2 (4ª EIC a esquerda do esterno), V3 (entre V2 e V4), V4 (5º EIC, na linha hemiclavicular), V5 (5º EIC, na linha axilar anterior), V6 (5º EIC, linha axilar média). Medem a diferença de potencial entre o tórax e o nodo átrio-ventricular (GUYTON, HALL, 2011).

Considera-se positivo o eletrodo colocado nas seis posições diferentes sobre o tórax, sendo o polo negativo situado no dorso do indivíduo (PASTORE, GRUPI, MOFFA, 2006).

Cada derivação deve ser digitalizada separadamente, sendo assim, a derivação selecionada poderá ser visualizada, para a posterior digitalização.

Posteriormente, a opção “show detected waveform on the ECG image” deve ser marcada. Sendo assim, a forma de onda poderá ser visualizada. As opções “threshold for background removal” e “signal smooth” devem ser ajustadas de acordo com o sinal original.

Após o término do processo de digitalização, seleciona-se a opção “save digitized ECG”. O sinal eletrocardiográfico poderá ser salvo em arquivo .txt e .mat. Assim, é possível fazer o processamento e análise dos sinais.

Realizou-se a coleta de dados no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia.

As impressões de papel foram selecionadas de forma randômica. Após a coleta dos registros eletrocardiográficos dos pacientes, os exames foram escaneados por meio do Scanner HP Photosmart C4780. A Figura 6.2 demonstra uma derivação eletrocardiográfica escaneada.

A partir das imagens dos exames, em formato .png, realizou-se a digitalização dos mesmos.



Figura 6.2. Exemplo de uma derivação escaneada.

6.3 Resultados

A obtenção das doze derivações escaneadas de cada paciente possibilitou a realização da digitalização de cada uma delas.

A Figura 6.3 demonstra a interface do usuário de um exemplo de uma derivação, neste caso a derivação D1, a qual passou pelo processo de digitalização.



Figura 6.3. Digitalização de uma derivação eletrocardiográfica impressa.

Este processo é realizado para cada derivação (periféricas e precordiais) de todos os pacientes incluídos no estudo.

A Figura 6.4 consiste em um sinal digitalizado.

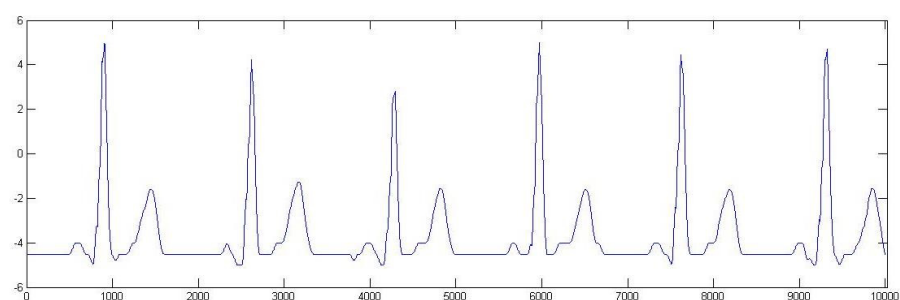


Figura 6.4. Sinal eletrocardiográfico digitalizado (Matlab).

6.4 *Software* ECGLab

O desenvolvimento do método de digitalização de eletrocardiogramas impressos, ECGLab, teve como objetivo a obtenção de sinais digitais, para posterior realização de correlações para a avaliação dos sinais digitalizados, comparados aos ECGs impressos.

A validação inclui principalmente a comparação entre as medidas do ECG, incluindo durações e amplitudes de ondas, segmentos e intervalos a partir do traçado impresso e aquela obtida com o ECG digitalizado.

Apesar da obtenção de ECGs impressos ser vista atualmente por muitos pesquisadores como uma técnica obsoleta, devido à ampla comercialização de eletrocardiógrafos digitais, destaca-se a relevância de inúmeros ECGs clinicamente importantes armazenados em registros de papel e a necessidade de ferramentas confiáveis para digitalizar estes traçados para armazenamento em bases de dados digitais. Além disso, verifica-se ampla utilização de traçados impressos em hospitais e clínicas.

Foram selecionadas 12 derivações eletrocardiográficas. Comparou-se as medidas dos valores manuais obtidos da duração da onda P, duração do intervalo QRS e duração da onda T a partir dos eletrocardiogramas impressos e os valores obtidos do sinal digital.

Posteriormente, realizou-se a comparação entre 70 medidas manuais e aquelas obtidas no software ECGLab, para duração e amplitude das ondas P, QRS, T e duração do intervalo PR.

6.5 Processamento de imagens

Os passos do processamento de imagens para a extração da forma de onda do eletrocardiograma foram: 1. A imagem é convertida para tons de cinza; 2. O fundo da imagem é removido por meio de limiarização; 3. A forma de onda é obtida por meio da conversão de valores de pixels em amplitude de escala arbitrária; 4. Interpolação é aplicada ao sinal obtido a fim de assegurar que não existem falhas no sinal obtido; 5. o sinal é normalizado e amostrado de acordo com parâmetros pré-estabelecidos pelo usuário.

6.6 Resultados

6.6.1 Realização das medidas manuais e automáticas

A Tabela 6.1 apresenta as medidas manuais, além das medidas obtidas a partir do *software* referentes à duração da onda P.

Tabela 6.1. Medidas das durações da onda P.

Derivação	Duração da onda P		
	Manual		<i>Software</i>
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
D1	2,7	0,108	0,109
D2	2,4	0,096	0,098
D3	2,6	0,104	0,106
aVR	2,5	0,100	0,101
aVL	2,6	0,104	0,103
aVF	2,6	0,104	0,104
V1	2,6	0,104	0,105
V2	2,7	0,108	0,107
V3	2,6	0,104	0,106
V4	2,6	0,104	0,104
V5	2,6	0,104	0,103
V6	2,7	0,108	0,105

Primeiramente, foi realizada a medida manual da duração da onda P nos eletrocardiogramas impressos, em milímetros, sendo que cada segundo corresponde a 25 mm (1s = 25 mm). Posteriormente, foi realizada a digitalização do sinal e a obtenção da duração da onda P a partir do *software*.

Os mesmos passos foram realizados para as medidas de duração referentes ao intervalo QRS e à onda T, como representado nas Tabelas 6.2 e 6.3.

Tabela 6.2. Medidas das durações do intervalo QRS.

Derivação	Duração do intervalo QRS		
	Manual		<i>Software</i>
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
D1	1,4	0,056	0,060
D2	1,9	0,076	0,077
D3	1,7	0,068	0,069

aVR	1,4	0,056	0,059
aVL	1,6	0,064	0,067
aVF	1,7	0,068	0,068
V1	1,9	0,076	0,078
V2	1,95	0,078	0,080
V3	1,85	0,074	0,076
V4	1,9	0,076	0,077
V5	1,75	0,070	0,071
V6	1,4	0,056	0,067

Tabela 6.3. Medidas das durações da onda T.

Derivação	Duração da onda T		
	Manual	<i>Software</i>	
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
D1	4,1	0,164	0,170
D2	4,4	0,176	0,180
D3	4,3	0,172	0,172
aVR	4,2	0,168	0,171
aVL	4,5	0,180	0,181
aVF	4,8	0,192	0,194
V1	4,7	0,188	0,190
V2	4,6	0,184	0,182
V3	4,9	0,196	0,196
V4	4,5	0,180	0,182
V5	4,5	0,180	0,180
V6	4,3	0,172	0,174

Para a comparação entre as médias, realizou-se o teste t para média de uma amostra, utilizando o *software Statistica*. Após a obtenção das medidas manuais das durações das ondas, estas foram comparadas com os valores referentes ao *software* desenvolvido, ECGLab.

Considerou-se a hipótese nula como $H_0: \mu = \mu_0$, ou seja, que as médias das medidas manuais seriam iguais às médias das medidas do *software*. Já a hipótese alternativa foi considerada como $H_1: \mu \neq \mu_0$, ou seja, as médias seriam diferentes.

Equação para o cálculo do t-valor:

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{S/\sqrt{n}} \quad (6.1)$$

Onde:

$\bar{x}$ = média obtida através das medidas realizadas

μ_0 = média da literatura

S = desvio padrão amostral

n = tamanho da amostra

A Tabela 6.4 apresenta o teste t realizado para as medidas referentes à duração da onda P, a Tabela 6.5 representa o teste t das medidas de duração do intervalo QRS e a Tabela 6.6 contém os dados do teste t da duração da onda T. Nessas tabelas, a representação *grupo 1* é referente às medidas manuais e *grupo 2* às medições do *software*.

Tabela 6.4. Test t para duração da onda P.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,104	0,104	0,847	0,003	0,002

Tabela 6.5. Test t para duração do intervalo QRS.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,068	0,070	0,422	0,008	0,006

Tabela 6.6. Test t para duração da onda T.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,179	0,181	0,660	0,009	0,008

A partir da análise estatística das tabelas 6.4, 6.5 e 6.6, aceita-se a hipótese nula (H_0), que as médias das medidas manual e do *software* ECGLab não possuem diferença estatística, com p-valor maior que 0,05 ($p > 0,05$).

6.6.2 Validação do *software*

A validação do *software* ECGLab foi realizada a partir da realização das medidas manuais e da obtenção dos valores gerados pelo *software*. Foram realizadas as medidas das derivações D2 de 10 eletrocardiogramas de pacientes com diagnóstico de ECG normal, totalizando 70 aferições manuais das seguintes medidas dos traçados eletrocardiográficos impressos: duração e amplitude da onda P, duração do intervalo PR, duração do complexo QRS, amplitude da onda R, duração e amplitude da onda T. Posteriormente, esses valores foram comparados aos obtidos dos sinais digitalizados (Tabelas 6.7 a 6.13).

Tabela 6.7. Duração da onda P referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Duração da onda P			
Pacientes - Derivação D2	Manual		Software
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
Paciente 1	2,4	0,096	0,098
Paciente 2	2,5	0,100	0,119
Paciente 3	3,3	0,132	0,134
Paciente 4	2,52	0,101	0,102
Paciente 5	3,0	0,120	0,120
Paciente 6	2,6	0,104	0,100
Paciente 7	2,7	0,108	0,107
Paciente 8	2,4	0,096	0,098
Paciente 9	2,5	0,100	0,101
Paciente 10	2,8	0,112	0,115

Tabela 6.8. Amplitude da onda P referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Amplitude da onda P			
Pacientes - Derivação D2	Manual		Software
	Medida (mm)	Amplitude (mV)	Amplitude (mV)
Paciente 1	1,4	0,14	0,137
Paciente 2	2,0	0,20	0,200
Paciente 3	1,1	0,11	0,100
Paciente 4	1,3	0,13	0,127
Paciente 5	2,0	0,20	0,212
Paciente 6	1,9	0,19	0,199
Paciente 7	1,1	0,11	0,108
Paciente 8	1,4	0,14	0,146
Paciente 9	2,4	0,24	0,244
Paciente 10	1,2	0,12	0,118

Tabela 6.9. Duração do intervalo PR referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Duração do intervalo PR			
Pacientes - Derivação D2	Manual		<i>Software</i>
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
Paciente 1	3,7	0,148	0,145
Paciente 2	4,8	0,192	0,194
Paciente 3	4,6	0,184	0,187
Paciente 4	3,8	0,152	0,154
Paciente 5	5,3	0,212	0,216
Paciente 6	3,7	0,148	0,145
Paciente 7	4,4	0,176	0,174
Paciente 8	5,0	0,200	0,198
Paciente 9	4,8	0,192	0,195
Paciente 10	5,2	0,208	0,204

Tabela 6.10. Duração do intervalo QRS referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Duração do intervalo QRS			
Derivação	Manual		<i>Software</i>
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
Paciente 1	1,9	0,076	0,077
Paciente 2	1,75	0,070	0,073
Paciente 3	2,8	0,112	0,118
Paciente 4	1,8	0,072	0,074
Paciente 5	1,9	0,076	0,076
Paciente 6	1,9	0,076	0,078
Paciente 7	1,8	0,072	0,072
Paciente 8	1,8	0,072	0,073
Paciente 9	1,7	0,068	0,070
Paciente 10	2,4	0,096	0,094

Tabela 6.11. Amplitude da onda R referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Amplitude da onda R			
Pacientes - Derivação D2	Manual		<i>Software</i>
	Medida (mm)	Amplitude (mV)	Amplitude (mV)
Paciente 1	9,1	0,91	0,914
Paciente 2	9,9	0,99	0,994
Paciente 3	9,5	0,95	0,951
Paciente 4	9,7	0,97	0,979
Paciente 5	9,9	0,99	0,995

Paciente 6	9,5	0,95	0,943
Paciente 7	9,1	0,91	0,922
Paciente 8	9,8	0,98	0,997
Paciente 9	9,5	0,95	0,954
Paciente 10	9,5	0,95	0,953

Tabela 6.12. Duração da onda T referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Duração da onda T			
Derivação	Manual		Software
	Medida (mm)	Duração (s)	Duração (s)
Paciente 1	4,2	0,168	0,170
Paciente 2	4,0	0,160	0,169
Paciente 3	5,3	0,212	0,216
Paciente 4	4,7	0,188	0,180
Paciente 5	4,6	0,184	0,185
Paciente 6	5,0	0,200	0,202
Paciente 7	4,5	0,180	0,176
Paciente 8	5,4	0,216	0,215
Paciente 9	6,0	0,240	0,240
Paciente 10	5,0	0,200	0,196

Tabela 6.13. Amplitude da onda T referente à derivação D2 para 10 pacientes.

Amplitude da onda T			
Pacientes - Derivação D2	Manual		Software
	Medida (mm)	Amplitude (mV)	Amplitude (mV)
Paciente 1	3,4	0,34	0,337
Paciente 2	3,0	0,30	0,317
Paciente 3	3,0	0,30	0,311
Paciente 4	3,0	0,30	0,302
Paciente 5	4,0	0,40	0,398
Paciente 6	3,9	0,39	0,396
Paciente 7	5,0	0,50	0,503
Paciente 8	3,2	0,32	0,318
Paciente 9	3,8	0,38	0,385
Paciente 10	3,0	0,30	0,300

Realizou-se o teste t para média de uma amostra, utilizando o *software Statistica*, para a comparação entre as médias. Após a obtenção das medidas manuais das durações e amplitudes

das ondas, segmentos e intervalos, estas foram comparadas com os valores obtidos no software ECGLab.

Considerou-se a hipótese nula como $H_0: \mu = \mu_0$, ou seja, que as médias das medidas manuais seriam iguais às médias das medidas do *software*. Já a hipótese alternativa foi considerada como $H_1: \mu \neq \mu_0$, ou seja, as médias seriam diferentes. Sendo assim, aceita-se a hipótese nula (H_0), que as médias das medidas manuais e do *software* não apresentam diferença estatística, pois o p-valor é maior que 0,05 ($p > 0,05$).

As Tabelas 6.14 a 6.20 apresentam os resultados do teste t realizado para as medidas referentes à duração e amplitude da onda P, duração do intervalo PR, duração do complexo QRS, amplitude da onda R, duração e amplitude da onda T. Nessas tabelas, a representação *grupo 1* é referente às medidas manuais e *grupo 2* às medidas do *software*.

Tabela 6.14. Test t para duração da onda P.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,107	0,109	0,640	0,011	0,012

Tabela 6.15. Test t para amplitude da onda P.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,158	0,159	0,960	0,046	0,050

Tabela 6.16. Test t para duração do intervalo PR.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,181	0,181	1,000	0,024	0,025

Tabela 6.17. Test t para duração do complexo QRS.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,079	0,080	0,818	0,014	0,015

Tabela 6.18. Test t para amplitude da onda R.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,955	0,960	0,696	0,029	0,030

Tabela 6.19. Test t para duração da onda T.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,1948	0,1949	0,9925	0,0239	0,0233

Tabela 6.20. Test t para amplitude da onda T.

Média Grupo 1	Média Grupo 2	p-valor	Desvio padrão Grupo 1	Desvio padrão Grupo 2
0,353	0,357	0,900	0,065	0,064

6.7 Conclusão

Os resultados do teste t, referentes às medidas manuais e obtidas no ECGLab, para as durações e amplitudes da onda P, do intervalo QRS e da onda T, demonstram que a hipótese nula foi aceita, ou seja, não há diferença estatística entre as medidas manuais e as medidas do *software*.

O *software* ECGLab foi eficiente para a conversão dos eletrocardiogramas impressos em sinais digitais, com a obtenção de medidas das durações e amplitudes das ondas e dos intervalos eletrocardiográficos muito próximas às medidas manuais realizadas nos ECGs impressos.

Portanto, os resultados obtidos com os testes demonstraram concordância significativa entre os eletrocardiogramas derivados de traçados impressos e os sinais digitais adquiridos e processados pelo *software* ECGLab, o qual pode ser uma aplicação útil para utilização em hospitais, clínicas de cardiologia e unidades de dor torácica, além de possibilitar a realização de projetos de pesquisa que envolvam processamento e análise de sinais.

CAPÍTULO 7

7 AVALIAÇÃO DA ENTROPIA DOS SINAIS ELETROCARDIOGRÁFICOS

7.1 Introdução

Verificam-se propostas de novas técnicas e métodos para a análise das formas de onda eletrocardiográficas, as quais têm tendência de um comportamento não linear. Dos indicadores não lineares, um dos mais utilizados é a entropia, que possui diversas técnicas de quantificação. Entropia pode ser interpretada como uma medida do grau de incerteza que existe antes que uma escolha seja feita. Esse capítulo consiste em um estudo de caso que avalia um conjunto de índices estatísticos medidos a partir da diferença dos graus de irregularidade da série temporal do eletrocardiograma.

Nesta pesquisa, realizou-se a avaliação da entropia de pacientes com eletrocardiograma normal e pacientes acometidos por infarto do miocárdio, com alterações eletrocardiográficas e alteração de marcadores moleculares de lesão miocárdica.

7.2 Materiais e métodos

7.2.1 Caracterização do estudo

As coletas dos registros eletrocardiográficos dos pacientes foram realizadas no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Esta pesquisa foi previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisas da UFU, número do parecer 474.928.

A seleção dos pacientes foi baseada nos seguintes critérios de inclusão:

- Eletrocardiogramas normais: traçados eletrocardiográficos de pacientes sem alterações eletrofisiológicas;
- Eletrocardiogramas de pacientes acometidos por infarto do miocárdio: infarto da parede anterior ou inferior do miocárdio, em relação às variações presentes no segmento ST dos eletrocardiogramas, foram selecionados apenas os pacientes cujos ECGs continham supradesnívelamento significativo do segmento ST (maior que 1 mm) em duas ou mais derivações contíguas, que indicassem infarto anterior ou inferior; e realização do ECG no máximo oito horas após os primeiros sintomas do IAM (precordialgia).

Inicialmente, foram analisadas 48 derivações eletrocardiográficas: 24 derivações de pacientes sem alterações no ECG e 24 derivações de pacientes acometidos por IAM.

Após a coleta dos eletrocardiogramas impressos, os exames foram escaneados e, a partir da obtenção das imagens dos exames, realizou-se a digitalização e processamento dos sinais eletrocardiográficos em um *software* desenvolvido com esta finalidade - ECGLab (descrito no capítulo anterior). Posteriormente, selecionou-se um ciclo de cada derivação eletrocardiográfica para a análise de entropia.

Posteriormente à realização dos testes iniciais, realizou-se a coleta de traçados eletrocardiográficos de 60 pacientes, sendo: 20 ECGs normais, 20 ECGs de pacientes acometidos por infarto do miocárdio da parede anterior e 20 ECGs referentes a infarto da parede inferior, ambos com supradesnívelamento do segmento ST. Os ECGs impressos foram digitalizados e a avaliação da entropia para esses pacientes foi realizada a partir da seleção de 1 ciclo de cada derivação eletrocardiográfica.

7.2.2 Extração de características de entropia

Sabe-se que o conceito de informação é muito amplo para ser reduzido por uma única definição. No entanto, para qualquer distribuição de probabilidades é possível definir uma

quantidade denominada entropia que tem muitas propriedades que estão de acordo com o que uma medida de informação deve ter. Entropia é a medida de incerteza de uma variável aleatória, dada pela equação (7.1) (BRILLOUIN, 1962).

$$H = \sum p_i * \log \frac{1}{p_i} \quad (7.1)$$

Em que p_i indica a probabilidade de evento da distribuição de probabilidades de uma variável aleatória discreta.

É possível assumir, portanto, que entropia é uma função da distribuição da variável aleatória referindo apenas às suas probabilidades.

Dentre diversas técnicas de compressão de uma série temporal por meio da estimativa de entropia, este trabalho contempla três destas: (1) entropia amostral; (2) entropia aproximada; (3) entropia fuzzy (CHEN *et al.*, 2009). A Tabela 7.1 exibe uma descrição dessas técnicas.

Tabela 7.1. Descrição das técnicas de estimativa de entropia utilizadas (CHEN *et al.*, 2009).

Técnica	Descrição
Entropia Aproximada	Medida de complexidade calculada comparando pequenos grupos para um sinal. Essa comparação é baseada na distância entre o grupo, considerando-se os grupos semelhantes, se a distância for menor do que uma dada tolerância. Para um sinal totalmente previsível, esta medida deverá ser zero.
Entropia Amostral	Baseada na entropia aproximada, a diferença é que as comparações auto-correspondentes não são feitas, o que significa que dois grupos têm sua distância calculada e contabilizada apenas uma vez.
Entropia Fuzzy	Calculada de forma muito semelhante à entropia amostral. No entanto, o nível de similaridade entre os grupos é calculado por meio de uma função de pertinência, a qual deve ser uma função contínua que considera o valor da distância entre os dois grupos e os valores de tolerância em vez de uma simples comparação com a tolerância como nas características anteriores. A função de Gauss pode ser usada como função de pertinência, por exemplo.

Essas técnicas foram implementadas em uma *toolbox* desenvolvida em ambiente de programação Matlab o qual permitiu estimar três valores de entropia para cada uma das derivações eletrocardiográficas.

7.3 Resultados referentes aos testes iniciais

Os resultados apresentados são referentes aos testes iniciais, realizados para 48 derivações eletrocardiográficas. Observou-se, nos sinais eletrocardiográficos dos pacientes acometidos por infarto do miocárdio, menor entropia, comparados aos sinais eletrocardiográficos normais. A Figura 7.1 apresenta a soma de todas as derivações para cada algoritmo de entropia por paciente.

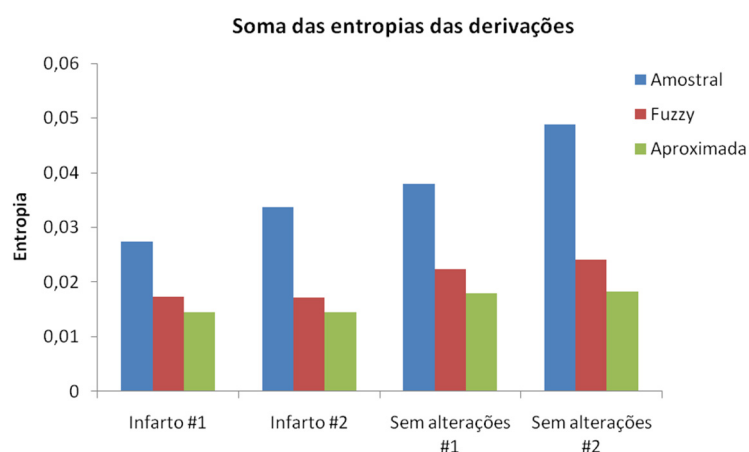


Figura 7.1. Soma das entropias das derivações.

A Figura 7.2 representa a soma de todas as derivações para cada algoritmo de entropia por paciente. As análises presentes nas Figuras 6.1 e 6.2 permitem uma avaliação mais geral sobre a entropia da série temporal.

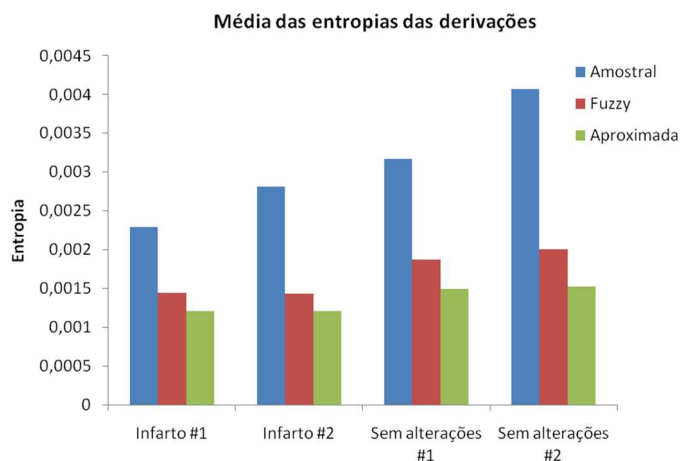


Figura 7.2. Média das entropias das derivações.

Após essa análise geral das entropias, os gráficos a seguir exibem a informação detalhada por derivação, visto que através destes é possível observar a contribuição de cada eletrodo e a entropia geral que pode ser inferida pela área do polígono formado pelos gráficos. Assim sendo, a Figura 7.3 demonstra as entropias amostral, fuzzy e aproximada para doze derivações do primeiro exame sem alterações, ou exame controle avaliado e a Figura 7.4 para doze derivações do segundo indivíduo com ECG normal.

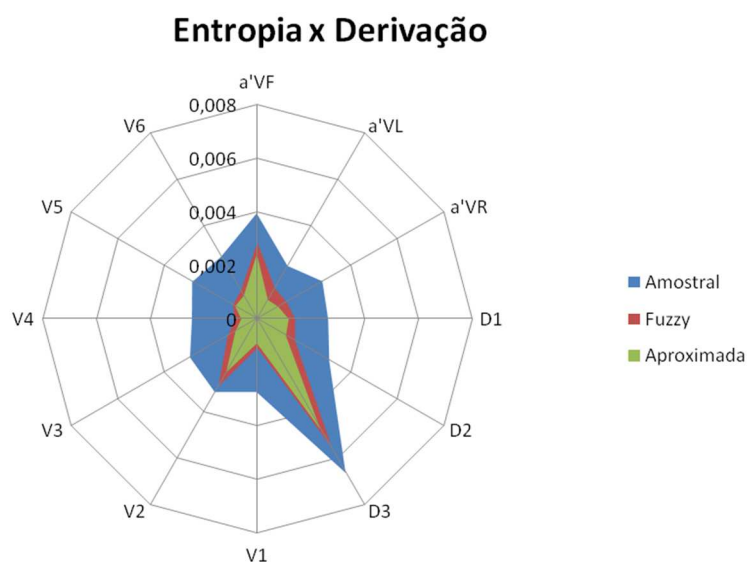


Figura 7.3. Análise da entropia do primeiro eletrocardiograma normal selecionado.

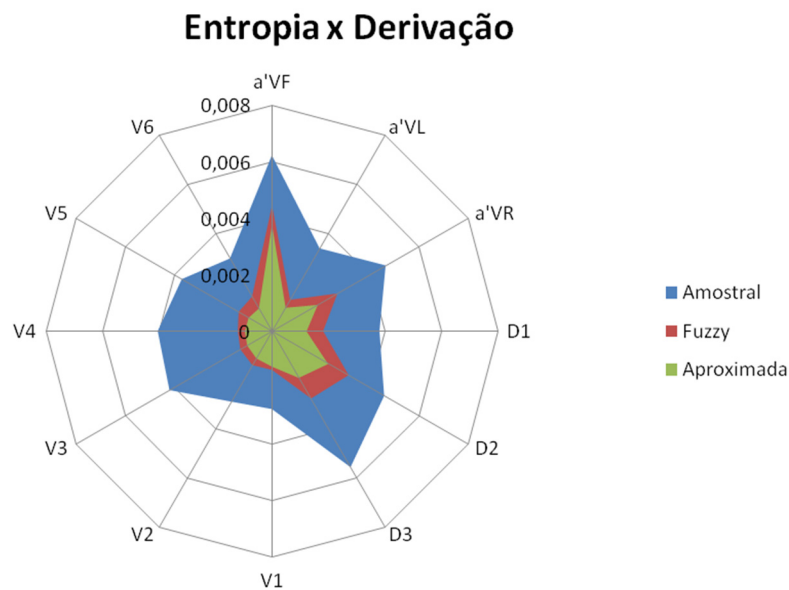


Figura 7.4. Análise da entropia do segundo eletrocardiograma normal selecionado.

As Figuras 7.5 e 7.6 apresentam as entropias em relação a cada derivação para os pacientes infartados.

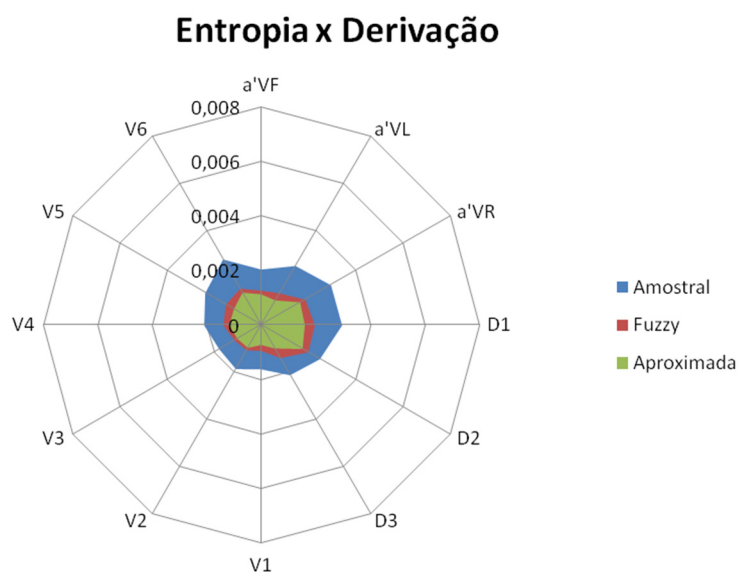


Figura 7.5. Análise da entropia do primeiro eletrocardiograma selecionado de um paciente acometido por infarto do miocárdio.

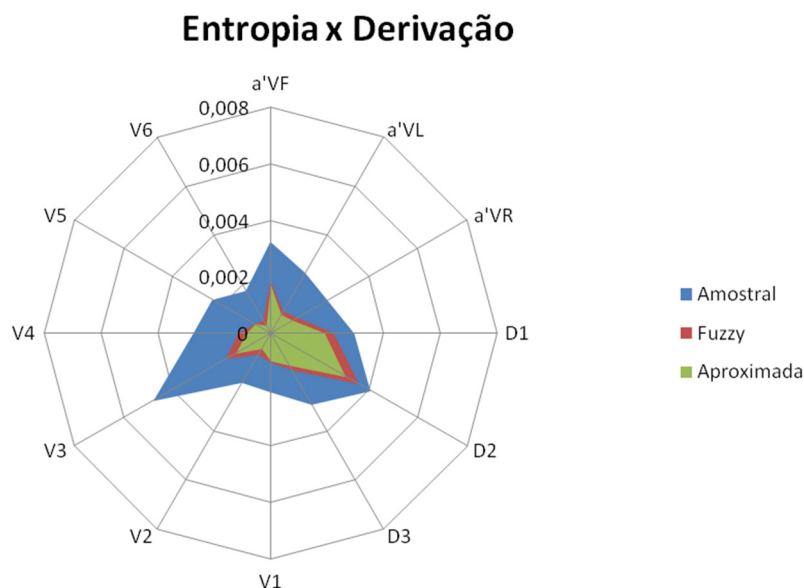


Figura 7.6. Análise da entropia do segundo eletrocardiograma selecionado de um paciente acometido por infarto do miocárdio.

7.4 Resultados referentes à avaliação da entropia para 60 pacientes

A avaliação da entropia foi realizada para 60 pacientes e os resultados podem ser observados nas tabelas e gráficos a seguir.

A Tabela 7.2 apresenta os valores de entropia obtidos para os eletrocardiogramas normais avaliados, os quais foram coletados de 20 pacientes sem alterações eletrofisiológicas, com diagnóstico de eletrocardiograma dentro dos limites da normalidade.

A Tabela 7.3 é referente aos valores de entropia obtidos para os eletrocardiogramas de 20 pacientes acometidos por IAM anterior, com supradesnívelamento do segmento ST.

Já a Tabela 7.4 contém aos valores de entropia obtidos para os eletrocardiogramas de 20 pacientes acometidos por IAM inferior, com supradesnívelamento do segmento ST.

Observa-se na Tabela 7.5 os valores das médias das entropias aproximada, amostral e fuzzy para cada derivação dos eletrocardiogramas normais. Na Tabela 7.6 estão apresentados os valores das médias das entropias para os eletrocardiogramas com IAM anterior e na Tabela 7.7, os valores para IAM inferior.

As Tabelas 7.8, 7.9 e 7.10 correspondem à média e à soma dos valores de entropia das derivações para ECG normal, IAM anterior e IAM inferior, respectivamente.

As Figuras 7.7, 7.8 e 7.9 demonstram a comparação entre os três tipos de entropia analisados para todas as derivações eletrocardiográficas dos eletrocardiogramas normais e dos eletrocardiogramas referentes aos infartos anterior e inferior.

Tabela 7.2. Entropia para ECG normal.

	Derivações Eletrocardiográficas																	
	D1			D2			D3			aVR			aVL			aVF		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0140	0,0085	0,0097	0,0113	0,0059	0,0068	0,0111	0,0054	0,0062	0,0100	0,0048	0,0058	0,0105	0,0083	0,0097	0,0111	0,0052	0,0062
Paciente 2	0,0087	0,0027	0,0032	0,0095	0,0043	0,0050	0,0183	0,0111	0,0119	0,0120	0,0053	0,0060	0,0108	0,0054	0,0059	0,0101	0,0061	0,0071
Paciente 3	0,0080	0,0031	0,0034	0,0091	0,0045	0,0052	0,0136	0,0073	0,0081	0,0076	0,0043	0,0047	0,0068	0,0024	0,0029	0,0113	0,0059	0,0066
Paciente 4	0,0104	0,0055	0,0064	0,0092	0,0038	0,0046	0,0091	0,0053	0,0061	0,0101	0,0048	0,0056	0,0108	0,0074	0,0086	0,0085	0,0041	0,0049
Paciente 5	0,0084	0,0029	0,0035	0,0077	0,0033	0,0037	0,0085	0,0037	0,0039	0,0081	0,0032	0,0036	0,0086	0,0042	0,0050	0,0081	0,0041	0,0046
Paciente 6	0,0104	0,0034	0,0040	0,0099	0,0022	0,0028	0,0172	0,0123	0,0139	0,0104	0,0027	0,0034	0,0102	0,0042	0,0049	0,0110	0,0034	0,0044
Paciente 7	0,0086	0,0043	0,0047	0,0097	0,0055	0,0063	0,0125	0,0064	0,0074	0,0106	0,0063	0,0071	0,0090	0,0038	0,0044	0,0121	0,0071	0,0080
Paciente 8	0,0117	0,0062	0,0072	0,0126	0,0060	0,0066	0,0156	0,0089	0,0099	0,0117	0,0057	0,0065	0,0100	0,0060	0,0070	0,0136	0,0046	0,0056
Paciente 9	0,0097	0,0043	0,0050	0,0105	0,0052	0,0059	0,0108	0,0069	0,0079	0,0098	0,0049	0,0056	0,0100	0,0043	0,0052	0,0136	0,0088	0,0100
Paciente 10	0,0097	0,0039	0,0046	0,0161	0,0107	0,0121	0,0102	0,0062	0,0071	0,0110	0,0053	0,0062	0,0084	0,0039	0,0045	0,0169	0,0121	0,0137
Paciente 11	0,0121	0,0075	0,0086	0,0090	0,0043	0,0049	0,0075	0,0026	0,0030	0,0089	0,0050	0,0058	0,0124	0,0072	0,0083	0,0082	0,0034	0,0039
Paciente 12	0,0114	0,0046	0,0052	0,0097	0,0028	0,0032	0,0090	0,0036	0,0041	0,0098	0,0031	0,0036	0,0143	0,0071	0,0081	0,0096	0,0036	0,0044
Paciente 13	0,0106	0,0032	0,0037	0,0088	0,0032	0,0036	0,0091	0,0038	0,0046	0,0096	0,0028	0,0032	0,0167	0,0058	0,0070	0,0090	0,0036	0,0042
Paciente 14	0,0118	0,0038	0,0049	0,0096	0,0036	0,0037	0,0094	0,0038	0,0047	0,0100	0,0032	0,0038	0,0152	0,0068	0,0072	0,0088	0,0034	0,0042
Paciente 15	0,0108	0,0058	0,0063	0,0089	0,0050	0,0056	0,0077	0,0041	0,0049	0,0102	0,0057	0,0059	0,0075	0,0041	0,0044	0,0088	0,0049	0,0055
Paciente 16	0,0093	0,0038	0,0047	0,0111	0,0062	0,0067	0,0077	0,0037	0,0042	0,0109	0,0054	0,0062	0,0082	0,0034	0,0041	0,0102	0,0073	0,0083
Paciente 17	0,0099	0,0035	0,0047	0,0115	0,0041	0,0048	0,0117	0,0060	0,0068	0,0110	0,0046	0,0054	0,0066	0,0059	0,0068	0,0112	0,0047	0,0056
Paciente 18	0,0099	0,0042	0,0048	0,0105	0,0039	0,0045	0,0113	0,0055	0,0062	0,0106	0,0040	0,0047	0,0092	0,0055	0,0063	0,0121	0,0052	0,0059
Paciente 19	0,0129	0,0088	0,0101	0,0129	0,0077	0,0087	0,0106	0,0060	0,0066	0,0127	0,0083	0,0093	0,0121	0,0117	0,0131	0,0123	0,0074	0,0082
Paciente 20	0,0108	0,0036	0,0047	0,0111	0,0044	0,0051	0,0179	0,0135	0,0151	0,0111	0,0039	0,0047	0,0122	0,0055	0,0064	0,0114	0,0043	0,0052

Derivações Eletrocardiográficas																		
	V1			V2			V3			V4			V5			V6		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0119	0,0051	0,0062	0,0102	0,0031	0,0037	0,0113	0,0034	0,0038	0,0107	0,0029	0,0037	0,0112	0,0033	0,0038	0,0111	0,0033	0,0038
Paciente 2	0,0100	0,0035	0,0046	0,0101	0,0025	0,0031	0,0081	0,0024	0,0028	0,0112	0,0034	0,0041	0,0100	0,0026	0,0030	0,0099	0,0033	0,0037
Paciente 3	0,0089	0,0030	0,0036	0,0090	0,0051	0,0060	0,0099	0,0056	0,0064	0,0064	0,0025	0,0029	0,0071	0,0018	0,0020	0,0078	0,0023	0,0026
Paciente 4	0,0096	0,0050	0,0057	0,0088	0,0031	0,0036	0,0100	0,0030	0,0035	0,0100	0,0027	0,0030	0,0100	0,0027	0,0030	0,0094	0,0037	0,0042
Paciente 5	0,0080	0,0028	0,0031	0,0093	0,0030	0,0036	0,0086	0,0046	0,0053	0,0083	0,0043	0,0048	0,0089	0,0035	0,0038	0,0085	0,0038	0,0042
Paciente 6	0,0110	0,0031	0,0040	0,0112	0,0040	0,0047	0,0115	0,0038	0,0043	0,0116	0,0028	0,0030	0,0113	0,0033	0,0037	0,0094	0,0024	0,0024
Paciente 7	0,0087	0,0038	0,0045	0,0103	0,0039	0,0046	0,0116	0,0041	0,0048	0,0097	0,0026	0,0031	0,0087	0,0030	0,0033	0,0084	0,0029	0,0035
Paciente 8	0,0132	0,0068	0,0076	0,0121	0,0037	0,0044	0,0119	0,0031	0,0035	0,0127	0,0034	0,0038	0,0121	0,0034	0,0039	0,0111	0,0043	0,0050
Paciente 9	0,0100	0,0042	0,0049	0,0108	0,0054	0,0062	0,0090	0,0033	0,0037	0,0100	0,0040	0,0047	0,0113	0,0048	0,0053	0,0102	0,0045	0,0052
Paciente 10	0,0128	0,0071	0,0079	0,0076	0,0050	0,0056	0,0100	0,0045	0,0052	0,0117	0,0027	0,0033	0,0106	0,0021	0,0029	0,0101	0,0028	0,0034
Paciente 11	0,0115	0,0070	0,0075	0,0097	0,0043	0,0050	0,0115	0,0031	0,0036	0,0103	0,0029	0,0035	0,0083	0,0029	0,0033	0,0085	0,0027	0,0034
Paciente 12	0,0102	0,0027	0,0031	0,0085	0,0025	0,0032	0,0118	0,0046	0,0050	0,0112	0,0043	0,0047	0,0112	0,0044	0,0049	0,0094	0,0037	0,0040
Paciente 13	0,0093	0,0024	0,0026	0,0080	0,0024	0,0030	0,0109	0,0034	0,0039	0,0115	0,0034	0,0041	0,0115	0,0042	0,0049	0,0099	0,0031	0,0036
Paciente 14	0,0089	0,0020	0,0024	0,0081	0,0022	0,0032	0,0116	0,0037	0,0044	0,0119	0,0038	0,0045	0,0118	0,0045	0,0051	0,0102	0,0028	0,0031
Paciente 15	0,0097	0,0045	0,0049	0,0077	0,0034	0,0037	0,0060	0,0025	0,0030	0,0101	0,0033	0,0034	0,0098	0,0023	0,0029	0,0096	0,0031	0,0036
Paciente 16	0,0075	0,0034	0,0038	0,0083	0,0034	0,0039	0,0102	0,0044	0,0051	0,0097	0,0035	0,0037	0,0090	0,0032	0,0035	0,0086	0,0030	0,0033
Paciente 17	0,0097	0,0034	0,0040	0,0114	0,0035	0,0037	0,0095	0,0022	0,0034	0,0110	0,0054	0,0061	0,0089	0,0026	0,0030	0,0100	0,0027	0,0034
Paciente 18	0,0089	0,0028	0,0035	0,0103	0,0036	0,0043	0,0100	0,0037	0,0046	0,0106	0,0060	0,0067	0,0092	0,0031	0,0036	0,0099	0,0028	0,0033
Paciente 19	0,0128	0,0077	0,0086	0,0080	0,0040	0,0045	0,0068	0,0026	0,0031	0,0096	0,0041	0,0047	0,0113	0,0048	0,0053	0,0117	0,0043	0,0048
Paciente 20	0,0067	0,0029	0,0035	0,0080	0,0037	0,0039	0,0069	0,0027	0,0031	0,0071	0,0025	0,0031	0,0108	0,0037	0,0041	0,0110	0,0035	0,0041

Tabela 7.3. Entropia para IAM anterior.

	Derivações Eletrocardiográficas																	
	D1			D2			D3			aVR			aVL			aVF		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0071	0,0035	0,0040	0,0061	0,0028	0,0030	0,0047	0,0035	0,0043	0,0085	0,0035	0,0042	0,0061	0,0030	0,0037	0,0056	0,0030	0,0034
Paciente 2	0,0073	0,0040	0,0046	0,0081	0,0038	0,0044	0,0087	0,0051	0,0057	0,0075	0,0043	0,0047	0,0130	0,0083	0,0087	0,0092	0,0028	0,0034
Paciente 3	0,0122	0,0089	0,0101	0,0079	0,0032	0,0038	0,0127	0,0099	0,0112	0,0089	0,0049	0,0055	0,0148	0,0134	0,0151	0,0093	0,0046	0,0054
Paciente 4	0,0061	0,0027	0,0033	0,0080	0,0044	0,0052	0,0067	0,0035	0,0041	0,0081	0,0042	0,0049	0,0069	0,0027	0,0033	0,0104	0,0068	0,0076
Paciente 5	0,0139	0,0083	0,0093	0,0128	0,0074	0,0087	0,0103	0,0073	0,0079	0,0108	0,0056	0,0068	0,0122	0,0086	0,0099	0,0103	0,0063	0,0072
Paciente 6	0,0134	0,0059	0,0059	0,0142	0,0023	0,0024	0,0131	0,0030	0,0033	0,0132	0,0037	0,0041	0,0137	0,0048	0,0050	0,0123	0,0031	0,0030
Paciente 7	0,0103	0,0067	0,0076	0,0109	0,0050	0,0057	0,0128	0,0059	0,0068	0,0107	0,0056	0,0065	0,0168	0,0104	0,0118	0,0113	0,0039	0,0044
Paciente 8	0,0090	0,0068	0,0077	0,0087	0,0041	0,0047	0,0081	0,0045	0,0051	0,0083	0,0042	0,0049	0,0080	0,0053	0,0060	0,0081	0,0039	0,0044
Paciente 9	0,0078	0,0052	0,0059	0,0116	0,0083	0,0091	0,0119	0,0073	0,0080	0,0084	0,0059	0,0065	0,0079	0,0054	0,0060	0,0117	0,0083	0,0094
Paciente 10	0,0066	0,0015	0,0020	0,0110	0,0040	0,0046	0,0074	0,0029	0,0038	0,0081	0,0022	0,0025	0,0058	0,0014	0,0019	0,0134	0,0069	0,0074
Paciente 11	0,0171	0,0116	0,0124	0,0071	0,0036	0,0045	0,0067	0,0041	0,0048	0,0084	0,0057	0,0063	0,0067	0,0038	0,0043	0,0081	0,0046	0,0053
Paciente 12	0,0059	0,0021	0,0026	0,0095	0,0031	0,0037	0,0079	0,0027	0,0031	0,0087	0,0041	0,0048	0,0068	0,0026	0,0033	0,0089	0,0028	0,0033
Paciente 13	0,0092	0,0063	0,0075	0,0135	0,0088	0,0095	0,0128	0,0087	0,0094	0,0121	0,0083	0,0089	0,0112	0,0080	0,0086	0,0116	0,0072	0,0076
Paciente 14	0,0065	0,0031	0,0035	0,0094	0,0035	0,0039	0,0070	0,0020	0,0024	0,0089	0,0041	0,0045	0,0060	0,0015	0,0025	0,0069	0,0027	0,0035
Paciente 15	0,0081	0,0042	0,0047	0,0094	0,0072	0,0079	0,0078	0,0041	0,0045	0,0107	0,0082	0,0092	0,0087	0,0046	0,0048	0,0086	0,0052	0,0058
Paciente 16	0,0095	0,0029	0,0034	0,0069	0,0018	0,0021	0,0150	0,0094	0,0110	0,0085	0,0021	0,0026	0,0107	0,0033	0,0045	0,0091	0,0043	0,0052
Paciente 17	0,0074	0,0041	0,0046	0,0103	0,0038	0,0044	0,0086	0,0021	0,0027	0,0101	0,0066	0,0077	0,0075	0,0024	0,0029	0,0096	0,0032	0,0036
Paciente 18	0,0081	0,0044	0,0052	0,0063	0,0045	0,0052	0,0062	0,0052	0,0058	0,0088	0,0074	0,0083	0,0066	0,0043	0,0047	0,0055	0,0039	0,0043
Paciente 19	0,0079	0,0042	0,0045	0,0083	0,0059	0,0067	0,0071	0,0050	0,0054	0,0083	0,0052	0,0058	0,0068	0,0033	0,0040	0,0058	0,0049	0,0056
Paciente 20	0,0044	0,0033	0,0038	0,0103	0,0062	0,0078	0,0095	0,0067	0,0077	0,0094	0,0079	0,0089	0,0065	0,0043	0,0050	0,0111	0,0090	0,0101

Derivações Eletrocardiográficas																		
	V1			V2			V3			V4			V5			V6		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0065	0,0020	0,0024	0,0045	0,0015	0,0018	0,0048	0,0022	0,0025	0,0040	0,0027	0,0031	0,0034	0,0030	0,0034	0,0074	0,0046	0,0052
Paciente 2	0,0074	0,0022	0,0027	0,0079	0,0028	0,0033	0,0088	0,0030	0,0035	0,0073	0,0028	0,0034	0,0075	0,0035	0,0042	0,0062	0,0035	0,0042
Paciente 3	0,0048	0,0018	0,0022	0,0069	0,0031	0,0035	0,0137	0,0083	0,0089	0,0084	0,0037	0,0044	0,0073	0,0022	0,0027	0,0063	0,0020	0,0023
Paciente 4	0,0052	0,0019	0,0023	0,0085	0,0046	0,0055	0,0042	0,0029	0,0034	0,0078	0,0033	0,0038	0,0058	0,0016	0,0019	0,0057	0,0022	0,0024
Paciente 5	0,0077	0,0028	0,0038	0,0068	0,0031	0,0037	0,0065	0,0024	0,0029	0,0078	0,0032	0,0039	0,0103	0,0035	0,0039	0,0107	0,0045	0,0048
Paciente 6	0,0061	0,0015	0,0020	0,0053	0,0014	0,0019	0,0054	0,0015	0,0017	0,0069	0,0028	0,0030	0,0077	0,0024	0,0027	0,0074	0,0046	0,0052
Paciente 7	0,0061	0,0014	0,0017	0,0081	0,0023	0,0027	0,0080	0,0025	0,0030	0,0116	0,0056	0,0063	0,0106	0,0040	0,0046	0,0091	0,0029	0,0033
Paciente 8	0,0072	0,0036	0,0040	0,0056	0,0018	0,0022	0,0049	0,0010	0,0014	0,0046	0,0019	0,0021	0,0086	0,0061	0,0069	0,0081	0,0031	0,0038
Paciente 9	0,0068	0,0036	0,0042	0,0053	0,0013	0,0016	0,0051	0,0020	0,0024	0,0054	0,0014	0,0017	0,0056	0,0023	0,0025	0,0067	0,0048	0,0053
Paciente 10	0,0072	0,0020	0,0023	0,0056	0,0024	0,0026	0,0055	0,0023	0,0027	0,0076	0,0037	0,0043	0,0080	0,0020	0,0025	0,0076	0,0017	0,0022
Paciente 11	0,0056	0,0021	0,0025	0,0056	0,0028	0,0032	0,0044	0,0019	0,0022	0,0046	0,0018	0,0021	0,0054	0,0026	0,0028	0,0058	0,0027	0,0031
Paciente 12	0,0061	0,0026	0,0030	0,0067	0,0024	0,0031	0,0062	0,0026	0,0030	0,0081	0,0035	0,0042	0,0081	0,0025	0,0030	0,0082	0,0042	0,0047
Paciente 13	0,0079	0,0039	0,0047	0,0055	0,0027	0,0032	0,0045	0,0019	0,0022	0,0050	0,0030	0,0034	0,0106	0,0063	0,0072	0,0093	0,0054	0,0060
Paciente 14	0,0054	0,0024	0,0027	0,0051	0,0018	0,0021	0,0051	0,0022	0,0026	0,0042	0,0031	0,0035	0,0084	0,0042	0,0045	0,0081	0,0034	0,0040
Paciente 15	0,0054	0,0033	0,0037	0,0039	0,0012	0,0017	0,0044	0,0018	0,0020	0,0053	0,0034	0,0041	0,0061	0,0026	0,0031	0,0091	0,0061	0,0068
Paciente 16	0,0118	0,0061	0,0071	0,0108	0,0042	0,0048	0,0117	0,0038	0,0046	0,0124	0,0047	0,0058	0,0063	0,0021	0,0025	0,0056	0,0024	0,0028
Paciente 17	0,0057	0,0021	0,0025	0,0051	0,0013	0,0018	0,0048	0,0016	0,0020	0,0056	0,0023	0,0027	0,0101	0,0043	0,0049	0,0081	0,0033	0,0039
Paciente 18	0,0042	0,0026	0,0031	0,0026	0,0010	0,0011	0,0029	0,0013	0,0015	0,0037	0,0016	0,0020	0,0061	0,0036	0,0041	0,0063	0,0040	0,0045
Paciente 19	0,0071	0,0034	0,0038	0,0045	0,0018	0,0021	0,0050	0,0020	0,0022	0,0055	0,0042	0,0047	0,0063	0,0046	0,0052	0,0044	0,0032	0,0035
Paciente 20	0,0119	0,0084	0,0094	0,0113	0,0071	0,0081	0,0051	0,0019	0,0023	0,0042	0,0018	0,0018	0,0040	0,0026	0,0028	0,0063	0,0024	0,0028

Tabela 7.4. Entropia para IAM inferior.

	Derivações Eletrocardiográficas																	
	D1			D2			D3			aVR			aVL			aVF		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0091	0,0025	0,0031	0,0075	0,0022	0,0028	0,0061	0,0024	0,0030	0,0084	0,0023	0,0026	0,0071	0,0025	0,0028	0,0068	0,0022	0,0027
Paciente 2	0,0071	0,0035	0,0041	0,0070	0,0034	0,0040	0,0084	0,0038	0,0045	0,0062	0,0028	0,0035	0,0092	0,0046	0,0052	0,0078	0,0039	0,0044
Paciente 3	0,0101	0,0037	0,0048	0,0083	0,0031	0,0037	0,0095	0,0033	0,0033	0,0097	0,0037	0,0045	0,0113	0,0036	0,0039	0,0085	0,0030	0,0034
Paciente 4	0,0099	0,0028	0,0034	0,0096	0,0040	0,0045	0,0118	0,0032	0,0042	0,0100	0,0041	0,0048	0,0096	0,0032	0,0037	0,0111	0,0036	0,0042
Paciente 5	0,0087	0,0035	0,0043	0,0083	0,0034	0,0040	0,0042	0,0024	0,0028	0,0091	0,0034	0,0039	0,0072	0,0044	0,0051	0,0058	0,0029	0,0034
Paciente 6	0,0077	0,0035	0,0040	0,0063	0,0025	0,0030	0,0095	0,0037	0,0048	0,0064	0,0023	0,0034	0,0100	0,0041	0,0054	0,0097	0,0046	0,0048
Paciente 7	0,0087	0,0050	0,0057	0,0091	0,0036	0,0043	0,0074	0,0030	0,0034	0,0102	0,0037	0,0043	0,0068	0,0055	0,0063	0,0097	0,0046	0,0054
Paciente 8	0,0051	0,0035	0,0040	0,0056	0,0029	0,0035	0,0058	0,0028	0,0034	0,0090	0,0072	0,0082	0,0057	0,0038	0,0044	0,0054	0,0034	0,0039
Paciente 9	0,0138	0,0051	0,0056	0,0071	0,0039	0,0044	0,0068	0,0033	0,0038	0,0080	0,0041	0,0051	0,0068	0,0021	0,0028	0,0066	0,0033	0,0037
Paciente 10	0,0076	0,0036	0,0043	0,0059	0,0017	0,0023	0,0075	0,0032	0,0037	0,0077	0,0040	0,0043	0,0066	0,0020	0,0030	0,0058	0,0016	0,0021
Paciente 11	0,0093	0,0033	0,0046	0,0073	0,0011	0,0017	0,0071	0,0025	0,0028	0,0079	0,0018	0,0023	0,0075	0,0040	0,0043	0,0075	0,0015	0,0020
Paciente 12	0,0101	0,0065	0,0074	0,0054	0,0045	0,0052	0,0054	0,0036	0,0040	0,0092	0,0083	0,0093	0,0081	0,0058	0,0066	0,0054	0,0044	0,0050
Paciente 13	0,0102	0,0056	0,0064	0,0089	0,0056	0,0063	0,0099	0,0050	0,0058	0,0105	0,0058	0,0066	0,0094	0,0047	0,0053	0,0089	0,0060	0,0069
Paciente 14	0,0132	0,0067	0,0076	0,0080	0,0062	0,0072	0,0056	0,0032	0,0038	0,0123	0,0084	0,0096	0,0073	0,0044	0,0051	0,0055	0,0033	0,0040
Paciente 15	0,0089	0,0035	0,0042	0,0094	0,0047	0,0055	0,0077	0,0016	0,0023	0,0112	0,0065	0,0075	0,0077	0,0014	0,0022	0,0082	0,0027	0,0033
Paciente 16	0,0075	0,0027	0,0033	0,0068	0,0034	0,0042	0,0055	0,0021	0,0026	0,0073	0,0028	0,0032	0,0057	0,0023	0,0027	0,0057	0,0030	0,0033
Paciente 17	0,0087	0,0038	0,0045	0,0085	0,0036	0,0043	0,0040	0,0026	0,0030	0,0084	0,0033	0,0039	0,0073	0,0044	0,0051	0,0064	0,0038	0,0044
Paciente 18	0,0087	0,0028	0,0035	0,0070	0,0030	0,0036	0,0065	0,0020	0,0022	0,0090	0,0037	0,0047	0,0070	0,0022	0,0027	0,0070	0,0029	0,0033
Paciente 19	0,0091	0,0029	0,0035	0,0068	0,0021	0,0030	0,0053	0,0021	0,0024	0,0109	0,0030	0,0043	0,0059	0,0011	0,0018	0,0056	0,0023	0,0029
Paciente 20	0,0117	0,0055	0,0064	0,0085	0,0030	0,0035	0,0082	0,0039	0,0047	0,0098	0,0039	0,0048	0,0133	0,0081	0,0093	0,0073	0,0029	0,0035

Derivações Eletrocardiográficas																		
	V1			V2			V3			V4			V5			V6		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
Paciente 1	0,0081	0,0023	0,0027	0,0076	0,0025	0,0027	0,0090	0,0022	0,0029	0,0096	0,0038	0,0044	0,0079	0,0025	0,0028	0,0080	0,0023	0,0028
Paciente 2	0,0051	0,0013	0,0022	0,0073	0,0028	0,0031	0,0082	0,0029	0,0038	0,0065	0,0026	0,0031	0,0050	0,0015	0,0020	0,0054	0,0019	0,0023
Paciente 3	0,0068	0,0019	0,0026	0,0077	0,0025	0,0028	0,0090	0,0033	0,0039	0,0100	0,0026	0,0029	0,0098	0,0036	0,0039	0,0086	0,0024	0,0026
Paciente 4	0,0081	0,0022	0,0028	0,0134	0,0023	0,0025	0,0119	0,0031	0,0035	0,0124	0,0022	0,0025	0,0128	0,0044	0,0052	0,0136	0,0070	0,0078
Paciente 5	0,0080	0,0029	0,0033	0,0073	0,0029	0,0034	0,0079	0,0036	0,0040	0,0081	0,0019	0,0026	0,0107	0,0035	0,0039	0,0092	0,0022	0,0029
Paciente 6	0,0060	0,0016	0,0022	0,0070	0,0021	0,0024	0,0092	0,0036	0,0042	0,0077	0,0024	0,0026	0,0058	0,0012	0,0013	0,0064	0,0018	0,0022
Paciente 7	0,0071	0,0021	0,0025	0,0098	0,0030	0,0030	0,0119	0,0030	0,0032	0,0091	0,0021	0,0027	0,0086	0,0031	0,0037	0,0099	0,0023	0,0028
Paciente 8	0,0090	0,0066	0,0075	0,0044	0,0020	0,0023	0,0041	0,0024	0,0027	0,0052	0,0037	0,0040	0,0074	0,0044	0,0051	0,0064	0,0030	0,0037
Paciente 9	0,0059	0,0034	0,0043	0,0056	0,0024	0,0030	0,0079	0,0036	0,0039	0,0138	0,0058	0,0063	0,0132	0,0031	0,0034	0,0157	0,0036	0,0041
Paciente 10	0,0121	0,0044	0,0041	0,0132	0,0035	0,0035	0,0060	0,0014	0,0017	0,0056	0,0012	0,0017	0,0072	0,0033	0,0037	0,0080	0,0028	0,0034
Paciente 11	0,0078	0,0019	0,0023	0,0073	0,0020	0,0026	0,0080	0,0024	0,0029	0,0085	0,0017	0,0021	0,0086	0,0021	0,0027	0,0082	0,0020	0,0027
Paciente 12	0,0099	0,0045	0,0050	0,0087	0,0021	0,0029	0,0098	0,0029	0,0033	0,0077	0,0019	0,0024	0,0087	0,0025	0,0031	0,0090	0,0026	0,0035
Paciente 13	0,0088	0,0046	0,0051	0,0101	0,0025	0,0030	0,0090	0,0030	0,0037	0,0104	0,0047	0,0053	0,0110	0,0049	0,0056	0,0096	0,0044	0,0050
Paciente 14	0,0079	0,0031	0,0036	0,0090	0,0026	0,0030	0,0083	0,0023	0,0026	0,0093	0,0024	0,0028	0,0093	0,0029	0,0034	0,0091	0,0033	0,0043
Paciente 15	0,0083	0,0039	0,0047	0,0088	0,0019	0,0023	0,0087	0,0018	0,0022	0,0095	0,0022	0,0026	0,0105	0,0026	0,0033	0,0099	0,0028	0,0036
Paciente 16	0,0059	0,0031	0,0036	0,0068	0,0019	0,0023	0,0085	0,0019	0,0023	0,0086	0,0023	0,0026	0,0080	0,0031	0,0032	0,0078	0,0027	0,0032
Paciente 17	0,0090	0,0033	0,0038	0,0080	0,0029	0,0032	0,0076	0,0033	0,0038	0,0084	0,0022	0,0028	0,0101	0,0034	0,0038	0,0096	0,0024	0,0029
Paciente 18	0,0091	0,0036	0,0034	0,0093	0,0037	0,0045	0,0099	0,0022	0,0027	0,0088	0,0028	0,0034	0,0084	0,0034	0,0037	0,0080	0,0029	0,0032
Paciente 19	0,0097	0,0049	0,0058	0,0089	0,0022	0,0027	0,0109	0,0013	0,0017	0,0108	0,0015	0,0018	0,0114	0,0026	0,0033	0,0108	0,0028	0,0035
Paciente 20	0,0098	0,0033	0,0046	0,0101	0,0032	0,0037	0,0126	0,0046	0,0055	0,0115	0,0041	0,0048	0,0108	0,0028	0,0035	0,0117	0,0036	0,0042

Tabela 7.5. Média das entropias das derivações - ECG normal.

Derivações	ECG normal		
	Média dos pacientes		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
D1	0,0104566	0,0046793	0,0054577
D2	0,0104425	0,0048241	0,0054896
D3	0,0114412	0,006309	0,0071341
aVR	0,0103033	0,0046675	0,0053544
aVL	0,0104801	0,0056402	0,0064901
aVF	0,0109044	0,0054668	0,0063284
V1	0,0041567	0,0041567	0,0048004
V2	0,0093754	0,0035951	0,0041893
V3	0,0098452	0,0035381	0,0041352
V4	0,0102548	0,0035286	0,0040439
V5	0,0101529	0,0033011	0,0037534
V6	0,0097363	0,0032414	0,0037284

Tabela 7.6. Média das entropias das derivações - IAM anterior.

Derivações	IAM anterior		
	Média dos pacientes		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
D1	0,00887685	0,00499295	0,0056223
D2	0,0095106	0,0046884	0,0053581
D3	0,0092534	0,0051479	0,003983071
aVR	0,00932545	0,0051874	0,0058793
aVL	0,00912875	0,00507665	0,0057985
aVF	0,00933415	0,0048665	0,00549435
V1	0,0068072	0,00298615	0,00350635
V2	0,0062806	0,0025217	0,002992
V3	0,00605455	0,00245735	0,002848
V4	0,006505	0,00301895	0,00350625
V5	0,00730625	0,0033045	0,0037781
V6	0,00732425	0,0035484	0,0040423

Tabela 7.7. Média das entropias das derivações - IAM inferior.

Derivações	IAM inferior		
	Média dos pacientes		
	E. Ap.	E. Am.	E. Fu.
D1	0,0092578	0,0040032	0,0047318
D2	0,0075676	0,0033937	0,0040382
D3	0,0071118	0,002996	0,0035318
aVR	0,0090589	0,00425475	0,00503105
aVL	0,00795835	0,00370425	0,00438025
aVF	0,00723305	0,0048665	0,00384595
V1	0,00811685	0,0032475	0,0038058
V2	0,00850885	0,00255255	0,00294025
V3	0,0089209	0,0027327	0,0032299
V4	0,0090827	0,00269285	0,00316545
V5	0,00924975	0,0030455	0,00353045
V6	0,00924135	0,0029497	0,0035248

Tabela 7.8. Média e soma das entropias das derivações - ECG normal.

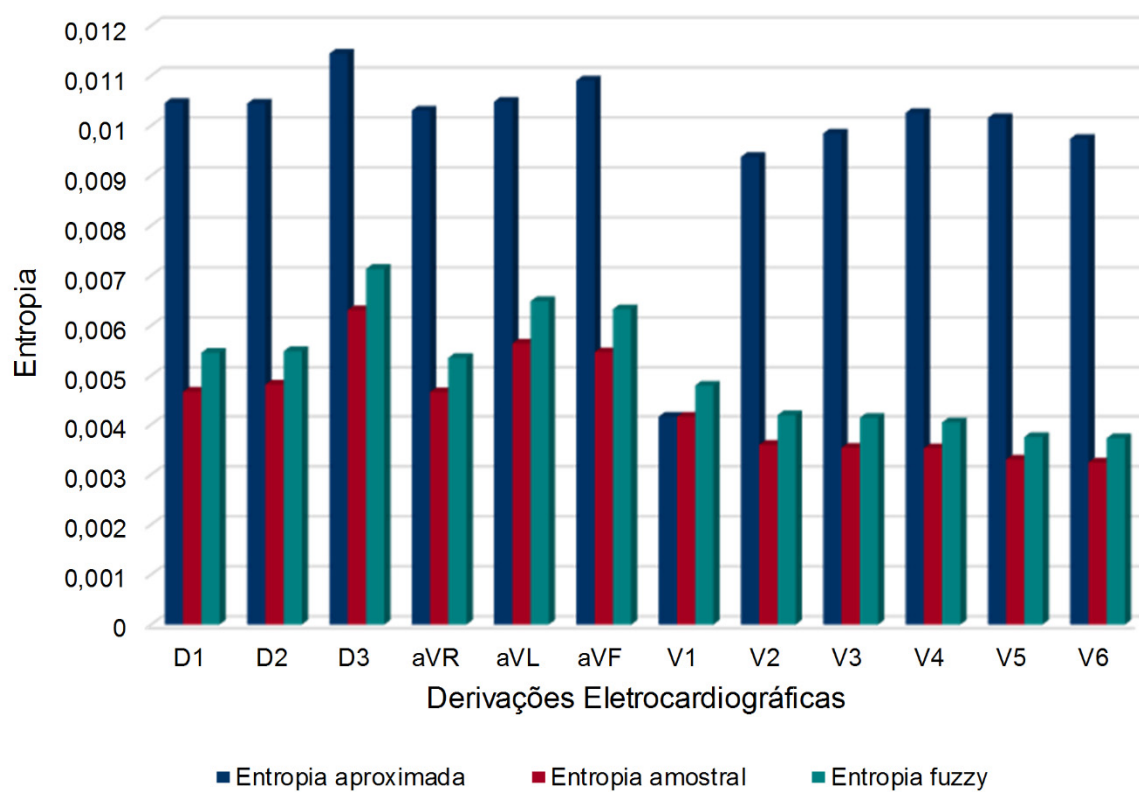
ECG normal			
	Entropia Aproximada	Entropia Amostral	Entropia Fuzzy
Média	0,0097958	0,0044123	0,0050754
Soma das médias	0,1175491	0,0529476	0,0609046

Tabela 7.9. Média e soma das entropias das derivações - IAM anterior.

IAM anterior			
	Entropia Aproximada	Entropia Amostral	Entropia Fuzzy
Média	0,0079756	0,0039831	0,0046484
Soma das médias	0,0957071	0,0477969	0,05578077

Tabela 7.10. Média e soma das entropias das derivações - IAM inferior.

IAM inferior			
	Entropia Aproximada	Entropia Amostral	Entropia Fuzzy
Média	0,0084423	0,0033699	0,003813
Soma das médias	0,1013079	0,0404392	0,0457557

**Figura 7.7.** Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas normais.

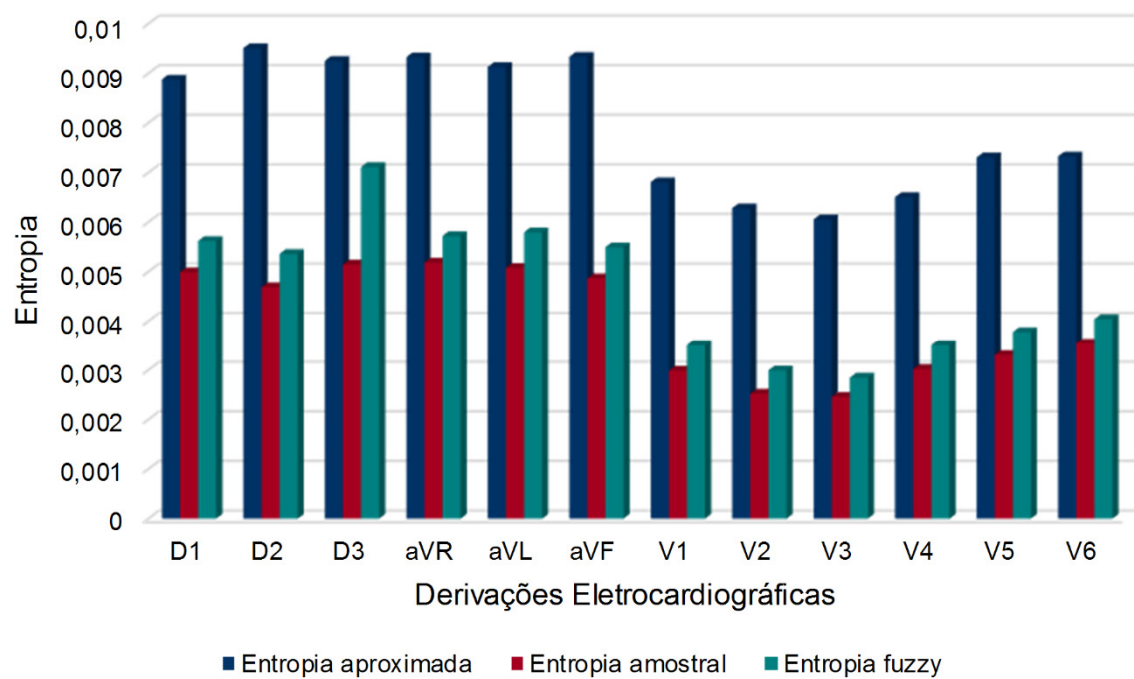


Figura 7.8. Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas de pacientes acometidos por IAM anterior.

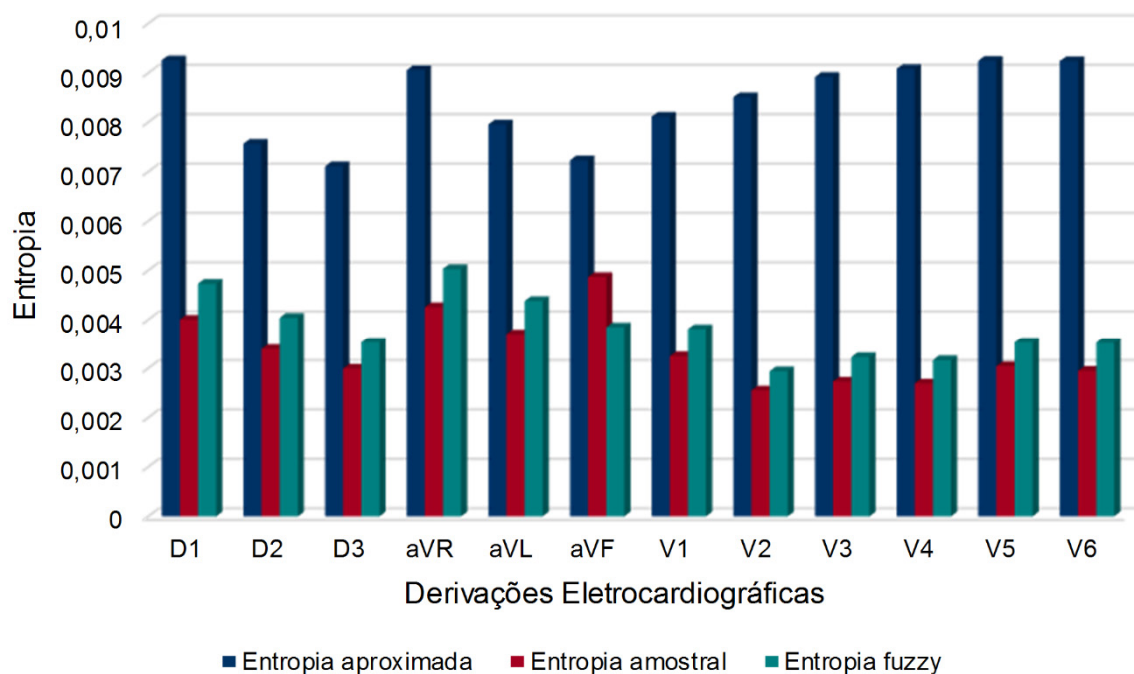


Figura 7.9. Avaliação da entropia para 20 eletrocardiogramas de pacientes acometidos por IAM inferior.

7.5 Discussão

▪ Avaliação inicial da entropia:

A partir da análise das 48 derivações eletrocardiográficas, as quais incluíram as derivações periféricas e precordiais de pacientes normais e acometidos por infarto do miocárdio, verificou-se que a entropia diminuiu nos traçados característicos de IAM.

A Figura 7.1 demonstra a soma das entropias das derivações para os quatro pacientes analisados. As entropias amostral, fuzzy e aproximada tiveram a mesma característica em todos os sinais, menor entropia no infarto do miocárdio. Esta mesma análise pode ser observada na Figura 7.2, que retrata a média das entropias para cada paciente.

As Figuras 7.3 e 7.4 representam as análises da entropia dos eletrocardiogramas de indivíduos sem alterações eletrocardiográficas, com destaque para a elevada entropia em todas as derivações.

Já nas Figuras 7.5 e 7.6 são demonstradas as análises da entropia dos sinais eletrocardiográficos de pacientes acometidos por infarto do miocárdio. Nota-se a menor entropia para as derivações provenientes de alterações isquêmicas.

▪ Avaliação da entropia para 60 pacientes:

Para os pacientes acometidos por infarto do miocárdio, foram encontrados valores menores de entropia. Isso pode ocorrer devido a presença de corrente de lesão, com menor massa miocárdica restante, menor sinal elétrico, menor amplitude de QRS e, portanto, menor variação do sinal.

Em relação ao supradesnivelamento do segmento ST, quanto mais derivações com elevação do segmento ST, menores foram os valores de entropia.

A entropia aproximada possibilitou diferenciação entre os eletrocardiogramas normais e aqueles referentes ao infarto anterior e inferior. Os valores das médias das entropias aproximadas das derivações foram maiores para os eletrocardiogramas normais (Tabela 7.5), seguidos pelo IAM inferior (Tabela 7.7) e os menores valores foram referentes ao IAM anterior (Tabela 7.6). O mesmo ocorreu para a soma das entropias (Tabelas 7.8 a 7.10).

A derivação V1 localiza-se distante da maior massa miocárdica, pois se situa em cima do átrio direito. Sendo assim, observa-se menor entropia de V1 no ECG normal, em relação às demais derivações (Figura 7.7). Além disso, observa-se que os valores de entropia do ECG normal são maiores que os valores referentes ao infarto do miocárdio.

Quanto a localização do infarto, observou-se que para os pacientes com IAM anterior, há menores valores de entropia nas derivações V1 a V6 (Figura 7.8). Já para os pacientes com IAM inferior, verificou-se menor entropia nas derivações D2, D3 e aVF (Figura 7.9), correspondentes à parede do infarto.

Nas derivações acometidas, de acordo com a localização do infarto, observa-se menor entropia.

No infarto inferior, observa-se menor massa miocárdica acometida. Já no infarto anterior, verifica-se menor entropia, pois há supradesnívelamento em maior número de derivações – massa maior acometida, em relação ao IAM inferior.

O IAM determina um sinal eletrocardiográfico mais previsível, portanto com menor variabilidade, e menor entropia.

A entropia pode ter valor prognóstico, pois quanto maior a massa de ventrículo acometida, pior o prognóstico e determina menor entropia.

Hipóteses a serem testadas:

- Todas as questões levantadas com relação a entropia são bastante recentes e definem algumas hipóteses a serem testadas em futuros estudos;
- Observar se a redução da entropia em coronariopatas crônicos poderia preceder à ocorrência de eventos isquêmicos.

7.6 Conclusão

O eletrocardiograma é um dos exames mais utilizados na prática clínica para o diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da evolução de síndromes coronarianas isquêmicas.

A partir do processamento dos sinais eletrocardiográficos é possível realizar a predição de eventos isquêmicos, possibilitando tratamento precoce e melhor prognóstico para os pacientes.

Tendo em vista a importância da análise das características do sinal eletrocardiográfico e das possíveis aplicações clínicas, foram realizados esses cálculos e avaliações

eletrofisiológicas para análise de uma das possíveis características a serem implementadas na avaliação destes sinais.

Portanto, a entropia mostrou-se uma importante característica para a discriminação de traçados sem alterações eletrocardiográficas e aqueles com alterações relacionadas à ocorrência de coronariopatias. Além de distinguir traçados eletrocardiográficos de pacientes acometidos por infarto do miocárdio e diferenciá-los quanto a localização, anterior ou inferior.

CAPÍTULO 8

8 CONCLUSÃO

O diagnóstico do infarto agudo do miocárdio é realizado a partir da verificação de alterações no exame clínico, alterações eletrocardiográficas e biomarcadores elevados, dentre estes, destaca-se a troponina T e proteína C reativa.

A proteína C reativa é uma proteína de fase aguda considerada marcador para inflamação e para doenças cardiovasculares. Evidências indicam que a aterosclerose é uma doença inflamatória imune-mediada. O exame de PCR tem alta sensibilidade para predição de risco cardiovascular.

A troponina T é um importante biomarcador de eventos isquêmicos, a qual é utilizada para confirmação do diagnóstico de infarto do miocárdio, juntamente com alterações clínicas e eletrocardiográficas. A troponina destaca-se entre os biomarcadores, devido à sua alta sensibilidade, especificidade e importância clínica.

Tendo em vista a importância de melhoria dos métodos de detecção e quantificação dos biomarcadores, esta pesquisa consistiu no desenvolvimento de imunossensores para detecção de PCR e TnT.

Os imunossensores desenvolvidos para detecção de proteína C reativa com utilização de voltametria de pulso diferencial (eletrodo *screen printed* de ouro) e ressonância de plasma de superfície (eletrodo de ouro) demonstraram eficácia e potencial utilização como auxílio diagnóstico e monitoramento da evolução de situações clínicas associadas a cardiopatias. Além disso, os resultados de microscopia de força atômica e espectroscopia de impedância eletroquímica comprovaram a eficácia da diferenciação entre pacientes positivos e negativos.

O imunossensor desenvolvido para detecção de troponina T, com utilização do eletrodo *screen printed* de grafite e detecção dos picos de oxidação por meio de voltametria de pulso

diferencial, demonstrou eficácia e potencial utilização como auxílio diagnóstico do infarto do miocárdio. A microscopia de força atômica demonstrou a modificação da morfologia da superfície dos eletrodos e dos valores de rugosidade, sendo possível distinguir os soros de pacientes positivos e negativos.

Além disso, para associar a detecção mais rápida dos biomarcadores com aprimoramento da análise eletrocardiográfica, desenvolveu-se um *software* para digitalização de eletrocardiogramas impressos, para posterior cálculo da entropia eletrocardiográfica.

O *software* ECGLab foi eficiente para a conversão dos eletrocardiogramas impressos em sinais digitalizados, com medidas das durações e amplitudes das ondas e dos intervalos eletrocardiográficos muito próximas às medidas manuais realizadas nos ECGs impressos.

Os resultados obtidos com os testes demonstraram concordância significativa entre os eletrocardiogramas derivados de traçados impressos e os sinais digitais adquiridos e processados pelo *software* ECGLab, que pode ser uma aplicação útil para a utilização em hospitais, clínicas de cardiologia e unidades de dor torácica, além de possibilitar a realização de projetos de pesquisa que envolvam processamento e análise destes sinais.

O processamento dos sinais eletrocardiográficos possibilita a realização da predição de eventos isquêmicos, possibilitando tratamento precoce e melhor prognóstico para os pacientes. Realizou-se assim, a partir dos sinais digitalizados, o cálculo da entropia aproximada, amostral e fuzzy.

A entropia mostrou-se uma importante característica para a discriminação de traçados sem alterações eletrocardiográficas e aqueles com alterações relacionadas à ocorrência de coronariopatias. Além de distinguir traçados eletrocardiográficos de pacientes acometidos por infarto do miocárdio e diferenciá-los quanto a localização, anterior ou inferior.

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

A partir da obtenção de dados eletrofisiológicos e os dados referentes aos imunossensores (detecção e quantificação de PCR e TnT), é possível realizar a avaliação e acompanhamento da evolução dos pacientes. Sendo assim, há contribuição para a obtenção de um diagnóstico mais rápido, a partir do cálculo da entropia e utilização de imunossensores e melhor prognóstico na síndrome coronária aguda.

REFERÊNCIAS

1. ACHAR, S. A.; KUNDU, S.; NORCROSS, W. A. Diagnosis of acute coronary syndrome. **American Family Physician**, 72 (1): 119-126, 2005.
2. AIRES, M. M. A. **Fisiologia**. 2ª ed., Guanabara Koogan, 1999.
3. ALDOUS, S. J. Cardiac biomarkers in acute myocardial infarction. **International Journal of Cardiology**, 164, 282-294, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.01.081>
4. ALGARRA, M.; GOMES, D.; ESTEVES DA SILVA, J. C. Current analytical strategies for C-reactive protein quantification in blood. **Clinica Chimica Acta**, 415, 1-9, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.09.007>
5. ALPERT, J. S.; THYGESEN, K. Myocardial infarction redefined - a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, 36 (3): 959-969, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0735-1097\(00\)00804-4](https://doi.org/10.1016/S0735-1097(00)00804-4)
6. ANDERSEN, M. P.; TERKELSEN, C. J.; SORENSEN, J. T.; KALTOFT, A. K.; NIELSEN, S. S.; STRUIJK, J. J.; BOTKER, H. E. The ST injury vector: electrocardiogram-based estimation of location and extent of myocardial ischemia. **Journal of Electrocardiology**, 43: 121-131, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2009.12.001>
7. ANDERSON, J. L. 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, 472-489, 2005.
8. ASHWELL, G. J.; WILLIAMS, A. T.; BARNES, S. A.; CHAPPELL, S. L.; PHILLIPS, L. J.; ROBINSON, B. J.; URASINSKA-WOJCIK, B.; WIERZCHOWIEC, P.; GENTLE, I. R.; WOOD, B. J. Self-Assembly of amino-thiols via gold-nitrogen links and

- consequence for in situ elongation of molecular wires on surface-modified electrodes. **The Journal of Physical Chemistry C**, 115, 4200-4208, 2011. <https://doi.org/10.1021/jp200006j>
9. BABACAN, S.; PIVARNIK, P.; LETCHER, S.; RAND, A. G. Evaluation of antibody immobilization methods for piezoelectric biosensor application. **Biosensors and Bioelectronics**, 15 (11-12), 615-621, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(00\)00115-9](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(00)00115-9)
 10. BADILINI, F.; ERDEM, T.; ZAREBA, W.; MOSS, A. J. ECGScan: a method for conversion of paper electrocardiographic printouts to digital electrocardiographic files. **Journal of Electrocardiology**, 310-318, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2005.04.003>
 11. BARBAGELATA, A.; CALIFF, R. M.; SGARBOSSA, E. B.; KNIGHT, D.; MARK, D. B.; GRANGER, C. B.; ARMSTRONG, P. W.; ELIZARI, M.; BIRNBAUM, Y.; GRINFELD, L. R.; OHMAN, E. M.; WAGNER, G. S. Prognostic value of predischage electrocardiographic measurement of infarct size after thrombolysis: insights from GUSTO I Economics and Quality of Life substudy. **American Heart Journal**, 148 (5): 795-802, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.04.046>
 12. BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. **Bioquímica médica**. 1ª ed., Manole, 2000.
 13. BHALLA, V.; CARRARA, S.; SHARMA, P.; NANGIA, Y.; SUR, C. R. Gold nanoparticles mediated label-free capacitance detection of cardiac troponin I. **Sensors and actuators B: Chemical**, 161 (1), 761-768, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2011.11.029>
 14. BRAUNWALD, E.; ZIPES, D. P.; LIBBY, P. **Tratado de Medicina Cardiovascular**. 6ª ed., v. 1. São Paulo: Roca, 2003.
 15. BRIEGER, D.; EAGLE, K. A.; GOODMAN, S. G.; STEG, P. G.; 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**, 126 (2): 461-469, 2004. <https://doi.org/10.1378/chest.126.2.461>
 16. BRILLOUIN, L. **Science and Information Theory**, 2nd ed., Academic Press, New York, 1962.
 17. BRYAN, T.; LUO, X.; BUENO, P. R.; DAVIS, J. J. An optimised electrochemical biosensor for the label-free detection of C-reactive protein in blood. **Biosensors & bioelectronics**, 39 (1), 94-98, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.06.051>

18. CALABRÒ, P.; GOLIA, E.; YEH, E. T. H. Role of C-reactive protein in acute myocardial infarction and stroke: possible therapeutic approaches. **Current pharmaceutical biotechnology**, 13 (1): 4-16, 2012. <https://doi.org/10.2174/138920112798868764>
19. CALVOA, E. J.; DANILOWICZ, C. Amperometric Enzyme Electrodes, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 8, 563-574, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0103-50531997000600002>
20. CARNEIRO, E. F. **O eletrocardiograma - 10 anos depois**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Enéas Ferreira Carneiro, 1997.
21. CHAMBERS, J. P.; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L.; WEIS, A.; VALDES, J. J. Biosensor Recognition Elements. **Current issues in molecular biology**, 10, 1-12, 2008.
22. CHAN, D.; NG, L. L. Biomarkers in acute myocardial infarction Review. **BMC Medicine**, 8 (34): 1-11, 2010. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-8-34>
23. CHEN, J. C.; CHUNG, H. H.; HSU, C. T.; TSAI, D. M.; KUMAR, A. S.; ZEN, J. M. A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 110, 364-369, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.02.026>
24. CHEN, W.; ZHUANG, J.; YU, W.; WANG, Z. **Measuring complexity using FuzzyEn, ApEn, and SampEn**. Medical Engineering & Physics, 31, 61-68, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.medengphy.2008.04.005>
25. CHOI, J.W.; OH, B. K.; KIM, Y. K.; MIN, J. Nanotechnology in Biodevices. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, 17 (1): 5-14, 2007.
26. CLEMMENSEN, P.; GRANDE, P.; ALDRICH, H. R.; WAGNER, G. S. Evaluation of formulas for estimating the final size of acute myocardial infarcts from quantitative ST-segment elevation on the initial standard 12-lead ECG. **Journal of Electrocardiology**, 24 (1): 77-83, 1991. [https://doi.org/10.1016/0022-0736\(91\)90084-Y](https://doi.org/10.1016/0022-0736(91)90084-Y)
27. CLIFFORD, G. D. **Advanced Methods and Tools for ECG Data Analysis**. 1st ed. New York: Artech House Publishers, 2006.
28. COLLINSON, P. O.; BOA, F. G.; GAZE, D. C. Measurement of cardiac troponins. **Annals of Clinical Biochemistry**, 38, 423-49, 2001. <https://doi.org/10.1177/000456320103800501>
29. CONRAD, M. J.; JAROLIM, P. Cardiac Troponins and High-sensitivity Cardiac Troponin Assays. **Clinics in Laboratory Medicine**, 34 (1), 59-73, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.11.008>

30. COREY, K. E.; MAYNARD, C; PAHLM, O.; WILKINS, M. L.; ANDERSON, S. T.; CERQUEIRA, M. D.; PRYOR, A. D.; RAITT, M. H.; SELVESTER, R. H. S.; TURNER, J.; WEAVER, W. D.; WAGNER, G. S. Combined historical and electrocardiographic timing of acute anterior and inferior myocardial infarcts for prediction of reperfusion achievable size limitation. **The American Journal of Cardiology**, 83 (6): 826-831, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(98\)01042-X](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(98)01042-X)
31. DANIELSSON, B. Calorimetric biosensors. **Journal of Biotechnology**, 15 (3), 187-200, 1990. [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(90\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0168-1656(90)90026-8)
32. DING, P.; LIU, R.; LIU, S.; MAO, X.; HU, R.; LI, G. Reusable gold nanoparticle enhanced QCM immunosensor for detecting C-reactive protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 188, 1277-1283, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2013.07.099>
33. DU CLOS, T. W. Pentraxins: Structure, Function, and Role in Inflammation. **ISRN inflammation**, 2013, 1-22, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/379040>
34. ELHENDY, A.; GELEIJNSE, M. L.; ROELANDT, J. R. T. C.; DOMBURG, R. T. V.; CORNEL, J. H.; TENCATE, F. J.; POSTMA-TJOA, J.; REIJS, A. E. M.; EL-SAID, G. M.; FIORETTI, P. M. Evaluation by quantitative 99m-technetium MIBI SPECT and echocardiography of myocardial perfusion and wall motion abnormalities in patients with dobutamine-induced ST-segment elevation. **The American Journal of Cardiology**, 1 (76): 441-448, 1995. [https://doi.org/10.1016/S0002-9149\(99\)80127-1](https://doi.org/10.1016/S0002-9149(99)80127-1)
35. FERREIRA, A. A. P.; FUGIVARA, C. S.; BARROZO, S.; SUEGAMA, P. H.; YAMANAKA, H.; BENEDETTI, A.V. Electrochemical and spectroscopic characterization of screen-printed gold-based electrodes modified with self-assembled monolayers and Tc85 protein. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, 634, 111-122, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2009.07.018>
36. FONSECA, R. A.; RAMOS-JESUS, J., KUBOTA, L. T.; DUTRA, R. F. A nanostructured piezoelectric immunosensor for detection of human cardiac troponin T. **Sensors (Basel)**, 11 (11): 10785-97, 2011. <https://doi.org/10.3390/s111110785>
37. GE, Y.; WANG, T. J. Identifying novel biomarkers for cardiovascular disease risk prediction. **Journal of internal medicine**, 272 (5), 430-439, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2012.02589.x>
38. GILSTRAP, L. G.; WANG, T. J. Biomarkers and cardiovascular risk assessment for primary prevention: an update. **Clinical chemistry**, 58 (1), 72-82, 2012. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2011.165712>

39. GREEN, R. J.; FRAZIER, R. A.; SHAKESHEFF, K. M.; DAVIES, M. C.; ROBERTS, C.J.; TENDLER, S. J. B. Surface plasmon resonance analysis of dynamic biological interactions with biomaterials. **Biomaterials**, 21, 1823-1835, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00077-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00077-6)
40. GREGG, R. E.; DELUCA, D. C.; CHIEN, C. H.; HELFENBEIN, E. D.; ARIET, M. Automated serial ECG comparison improves computerized interpretation of 12-lead ECG. **Journal of Electrocardiology**, 45(6): 561-565, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2012.07.021>
41. GUPTAA, R. K.; PERIYAKARUPPANA, A.; MEYYAPPANA, M.; KOEHNEA, J. E. Label-free detection of C-reactive protein using a carbon nanofiber based biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, 59, 112-119, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2014.03.027>
42. GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 12ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
43. HAHN, S. A.; CHANDLER, C. Diagnosis and management of ST elevation myocardial infarction: a review of the recent literature and practice guidelines. **Mount Sinai Journal of Medicine**, 73 (1): 469-481, 2006.
44. HANKEN, D. G.; JORDAN, C. E.; FREY, B. L.; CORN, R. M. Surface Plasmon Resonance measurements of ultrathin organic films at electrode surfaces. **Electroanalytical Chemistry**, 20, 141-225, 1998.
45. HENNESSEY, H.; AFARA, N.; OMANOVIC, S.; PADJEN, A. L. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica chimica acta**, 643 (1-2): 45-53, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.04.009>
46. HINDMAN, N.; GRANDE, P.; HARRELL, F. E.; ANDERSON, C.; HARRISON, D.; IDEKER, R. E.; SELVESTER, R. H.; WAGNER, G. S. Relation between electrocardiographic and enzymatic methods of estimating acute myocardial infarct size. **The American Journal of Cardiology**, 58 (1): 31-35, 1986. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(86\)90236-5](https://doi.org/10.1016/0002-9149(86)90236-5)
47. HORACEK, B. M.; WARREN, J. W.; ALBANO, A.; PALMERI, M. A.; REMBERT, J. C.; GREENFIELD JR., J. C.; WAGNER, G. S. Development of an automated Selvester Scoring System for estimating the size of myocardial infarction from the electrocardiogram. **Journal of Electrocardiology**, 39: 162-168, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2005.08.013>

48. INFUSINO, F.; NICCOLI, G.; FRACASSI, F.; ROBERTO, M.; FALCIONI, E.; LANZA, G. A.; CREA, F. The central role of conventional 12-lead ECG for the assessment of microvascular obstruction after percutaneous myocardial revascularization. **Journal of Electrocardiology**, 47(1): 45-51, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2013.10.002>
49. IVERSEN, K.; KOBER, L.; GOTZE, J. P.; DALSGAARD, M.; NIELSEN, H.; BOESGAARD, S.; BAY, M.; KIRK, V.; NIELSEN, O. W. Troponin T is a strong marker of mortality in hospitalized patients. **International Journal of Cardiology**, 168 (2), 818-824, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.10.006>
50. JULIAN, D. G., COWAN, J. C., **Cardiologia**. 6ª ed. São Paulo: Santos, 1996.
51. KATZ, A. M. **Physiology of the heart**. 2ª ed. Raven Press: New York, 1992.
52. KEHL, D. W.; IQBAL, N.; FARD, A.; KIPPER, B. A.; DE LA PARRA LANDA, A.; MAISEL, A. S. Biomarkers in acute myocardial injury. **Translational research : the journal of laboratory and clinical medicine**, 159 (4): p. 252-64, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2011.11.002>
53. KOHLES, S. S.; BRADSHAW, S.; MASON, S. S.; LOOFT, F. J. A Multivariate logistical model for identifying the compressive sensitivity of single rat tactile receptors as nanobiosensors. **Journal of Nanotechnology in Engineering and Medicine**, 2 (1), 2011. <https://doi.org/10.1115/1.4002750>
54. KUMAR, D.; PRASAD, B. B. Multiwalled carbon nanotubes embedded molecularly imprinted polymer-modified screen printed carbon electrode for the quantitative analysis of C-reactive protein. **Sensors and Actuators B: Chemical**, 171-172, 1141-1150, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.06.053>
55. LEE, T. M. H. Over-the-counter biosensors: past, present, and future. **Sensors**, 8, 5535-5559, 2008. <https://doi.org/10.3390/s8095535>
56. LEWANDROWSKI, K. B. Cardiac markers of myocardial necrosis. A history and discussion of milestones and emerging new trends. **Clinics in Laboratory Medicine**, 34 (1): 31-41, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cll.2013.11.001>
57. LIU, J. T.; CHEN, C. J.; IKOMA, T.; YOSHIOKA, T.; CROSS, J. S.; CHANG, S. J.; TSAI, J. Z.; TANAKA, J. Surface plasmon resonance biosensor with high anti-fouling ability for the detection of cardiac marker troponin T. **Analytica Chimica Acta**, 703 (1): 80-6, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.07.019>

58. LORIA, V.; LEO, M.; BIASILLO, G.; DATO, I.; BIASUCCI, L. M. Biomarkers in acute coronary syndrome. **Biomarker Insights**, 3, 453-468, 2008. <https://doi.org/10.4137/BMI.S588>
59. LU, J.; MARJON, K. D.; MOLD, C.; DU CLOS, T. W.; SUN, P. D. Pentraxins and Fc receptors. **Immunological reviews**, 250 (1): 230-8, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2012.01162.x>
60. MADJID, M.; WILLERSON, J. T. Inflammatory markers in coronary heart disease. **British medical bulletin**, 100, 23-38, 2011. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldr043>
61. MEHRVAR, M.; BIS, C.; SCHARER, J. M.; MOO-YOUNG, M.; LUONG, J. H. Fiber-Optic Biosensors - Trends and Advances. **Analytical Sciences**, 16, 677-692, 2000. <https://doi.org/10.2116/analsci.16.677>
62. MITRA, S.; MITRA, M.; CHAUDHURI, B. B. Generation of digital time database from paper ECG records and Fourier transform-based analysis for disease identification. **Computers in Biology and Medicine**, 34(7):551-60, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2003.08.001>
63. MONTGOMERY, J. E.; BROWN, J. R. Metabolic biomarkers for predicting cardiovascular disease. **Vascular health and risk management**, 9, 37-45, 2013. <https://doi.org/10.2147/VHRM.S30378>
64. MURPHY, L. Biosensors and bioelectrochemistry. **Current Opinion in Chemical Biology**, 10, 177-184, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.02.023>
65. NAKAMURA, T.; SUCHIYA, T.; OHANA, T. Fabrication of sulfur-functionalized DLC films by photochemicalmodification and attachment of gold nanoparticles. **Applied Surface Science**, 317, 443-448, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.apsusc.2014.08.139>
66. NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**, 5ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2011.
67. NICOLAU, J. C.; TIMERMAN, A.; MARIN-NETO, J. A.; PIEGAS, L. S.; BARBOSA, C. J. D. G.; FRANCI, A. Sociedade Brasileira de Cardiologia. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia sobre angina instável e infarto agudo do miocárdio sem supradesnível do segmento ST. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 102 (3), Supl. 1, 1-61, 2014. <https://doi.org/10.5935/abc.2014S001>
68. NIELSEN, B. L. ST-segment elevation in acute myocardial infarction: Prognostic importance. **Circulation**, 48 (2): 338-345, 1973. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.48.2.338>
69. OLIVEIRA, A. A. S.; COSTA, D. A. S.; TEIXEIRA, I. F.; MOURA, F. C. C. Gold nanoparticles supported on modified red mud for biphasicoxidation of sulfur compounds:

- a synergistic effect, **Applied Catalysis B: Environmental**, 162, 475-482, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2014.07.003>
70. PALMERI, S. T.; HARRISON, D. G.; COBB, F. R.; MORRIS, K. G.; HARRELL, F. E.; IDEKER, R. E.; SELVESTER, R. H.; WAGNER, G. S. A QRS scoring system for assessing left ventricular function after myocardial infarction. **The New England Journal of Medicine**, 306 (1): 4-9, 1982. <https://doi.org/10.1056/NEJM198201073060102>
71. PASTORE, C. A., GRUPI, C. J., MOFFA, P. J. **Eletrocardiologia Atual: curso do Serviço de Eletrocardiologia do Incor**. São Paulo: Atheneu, 2006.
72. PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M.; TENNENT, G. A.; GALLIMORE, J. R.; KAHAN, M. C.; BELLOTTI, V.; HAWKINS, P. N.; MYERS, R. M.; SMITH, M. D.; POLARA, A.; COBB, A. J.; LEY, S. V.; AQUILINA, J. A.; ROBINSON, C.V.; SHARIF, I.; GRAY, G. A.; SABIN, C. A.; JENVEY, M. C.; KOLSTOE, S. E.; THOMPSON, D.; WOOD, S. P. Targeting C-reactive protein for the treatment of cardiovascular disease. **Nature**, 440, 1217-1221, 2006. <https://doi.org/10.1038/nature04672>
73. PROTEIN DATA BANK IN EUROPE. **Crystal structure of the 46 kDa domain of human cardiac troponin in the Ca²⁺ saturated form**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1j1d/summary.html>>. Acesso em: 10 jan. 2014.
74. PROTEIN DATA BANK IN EUROPE (PDBE). **Human C-Reactive Protein complexed with phosphocholine**. Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/pdbe-srv/view/entry/1b09/summary.html>>. Acesso em: 20 jan. 2014.
75. RAITT, M. H.; MAYNARD, C.; WAGNER, G. S. Relation between symptom duration before thrombolytic therapy and final myocardial infarct size. **Circulation**, 93 (1): 48-53, 1996. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.93.1.48>
76. RAMA, E. C.; GONZALEZ-GARCIA, M. B.; COSTA-GARCIA, A. Competitive electrochemical immunosensor for amyloid-beta 1-42 detection based on gold nanostructured Screen-Printed Carbon Electrodes, **Sensors and Actuators B: Chemical**, 201, 567-571, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2014.05.044>
77. RAMASAMY, I. Biochemical markers in acute coronary syndrome. **Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry**, 412 (15-16), 1279-96, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.04.003>

78. RAVEL, R. **Aplicações Clínicas de Dados Laboratoriais**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.
79. RAWLINGS, C. A. **Eletrocardiography: Biophysical Measurement Series**. Washington: SpaceLabs, 1991.
80. RIDKER, P. M. C-reactive protein: a simple test to help predict risk of heart attack and stroke. **Circulation**, 108(12): 81-85, 2003. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000093381.57779.67>
81. RUDE, R. E.; POOLE, W. K.; MULLER, J. E.; TURI, Z.; RUTHERFORD, J.; PARKER, C.; ROBERTS, R.; RAABE JR, D. S.; GOLD, H. K.; STONE, P. H.; WILLERSON, J. T.; BRAUNWALD, E. Eletrocardiographic and clinical criteria for recognition of acute myocardial infarction based on analysis of 3697 patients. **The American Journal of Cardiology**, 52 (8): 936-941, 1983. [https://doi.org/10.1016/0002-9149\(83\)90508-8](https://doi.org/10.1016/0002-9149(83)90508-8)
82. SABATINE, M. S.; MORROW, D. A.; JABLONSKI, K. A.; RICE, M. M.; WARNICA, J. W.; DOMANSKI, M.J.; HSIA, J.; GERSH, B. J.; RIFAI, N.; RIDKER, P. M.; PFEFFER, M. A.; BRAUNWALD, E. Prognostic significance of the Centers for Disease Control/American Heart Association high-sensitivity C-reactive protein cut points for cardiovascular and other outcomes in patients with stable coronary artery disease. **Circulation**, 115 (12): 1528-36, 2007. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.649939>
83. SCHOEN, F. J.: O coração. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia - bases patológicas das doenças**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.
84. SCHWEITZER, P. The electrocardiographic diagnosis of acute myocardial infarction in the thrombolytic era. **American Heart Journal**, 119 (3): 642-654, 1990. [https://doi.org/10.1016/S0002-8703\(05\)80288-1](https://doi.org/10.1016/S0002-8703(05)80288-1)
85. SILVA, B. V.; CAVALCANTI, I. T.; MATTOS, A. B.; MOURA, P.; SOTOMAYOR, M. P.; DUTRA, R. F. Disposable immunosensor for human cardiac troponin T based on streptavidin-microsphere modified screen-printed electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, 26 (3), 1062-7, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.08.051>
86. SILVA, B. V.; CAVALCANTI, I. T.; SILVA, M. M.; DUTRA, R. F. A carbon nanotube screen-printed electrode for label-free detection of the human cardiac troponin T. **Talanta**, 117, 431-7, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2013.08.059>
87. SINGH, V.; MARTINEZCLARK, P.; PASCUAL, M.; SHAW, E. S.; O'NEILL, W. W. Cardiac biomarkers - the old and the new: a review. **Coronary Artery Disease**, 21, 244-56, 2010. <https://doi.org/10.1097/MCA.0b013e3283338cd1f>

88. SOARES, J. L. M. F.; ROSA, D. D.; LEITE, V. R. S.; PASQUALOTTO, A. C. **Métodos diagnósticos**. 2ª ed., Porto Alegre: Artmed, 2012.
89. STRENG, A. S.; JACOBS, L. H. J.; SCHWENK, R. W.; CARDINAEELS, E. P. M.; MEEUX, S. J. R.; WODZIG, W. K. W. H.; DIEIJEN-VISSER, M. P. Cardiac troponin in ischemic cardiomyocytes: Intracellular decrease before onset of cell death. **Experimental and molecular pathology**, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2014.02.012>
90. THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, 16, 121-131, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)
91. TRANCHESI, J. **Eletrocardiograma normal e patológico**. 6ª ed. São Paulo: Atheneu, 1983.
92. TURNER, A. P. F.; KARUBE, I.; WILSON, G. S. **Biosensors: Fundamentals and applications**. Oxford University Press, 1987. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)85361-1](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)85361-1)
93. TYMECKI, L.; KONCKI, R. Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis, **Sensor and Actuators B: Chemical**, 113, 782-786, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2005.07.045>
94. UNIPROT. **P02741 (CRP_HUMAN)**. Disponível em: <<http://www.uniprot.org/uniprot/P02741>>. Acesso em: 02 fev. 2014.
95. van DEURSEN, C.J.; BLAAUW, Y.; WITJENS, M.I.; DEBIE, L.; WECKE, L.; CRIJNS, H. J.; PRINZEN, F.W.; VERNOOY, K. The value of the 12-lead ECG for evaluation and optimization of cardiac resynchronization therapy in daily clinical practice. **Journal of Electrocardiology**, 47(2):202-11, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2014.01.007>
96. VANGILDER, R. L.; DAVIDOV, D. M.; STINEHART, K. R.; HUBER, J. D.; TURNER, R. C.; WILSON, K. S.; HANEY, E.; DAVIS, S. M.; CHANTLER, P. D.; THEEKE, L.; ROSEN, C. L.; CROCCO, T. J.; GUTMANN, L.; BARR, T. L. C-reactive protein and long-term ischemic stroke prognosis. **Journal of clinical neuroscience: official journal of the Neurosurgical Society of Australasia**, 21 (4): 547-553, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2013.06.015>
97. VASATOVA, M.; PUDIL, R.; HORACEK, J. M.; BUCHLER, T. Current applications of cardiac troponin T for the diagnosis of myocardial damage. **Advances in Clinical Chemistry**, 61, 33-65, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407680-8.00002-6>

98. WAGNER, G. S. **Marriott's Practical Eletrocardiography**, 11th ed., Durham, North Carolina, Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
99. WALLACH, J. **Interpretação de Exames Laboratoriais**, 7^a ed. Rio de Janeiro: Editora Médica Científica Ltda, 2003.
100. WANG, J. From DNA biosensors to gene chips. **Nucleic Acids Research**, 28 (16): 3011-3016, 2000. <https://doi.org/10.1093/nar/28.16.3011>
101. WANG, X.; LIU, L. H.; RAMSTROM, O.; YAN, M. Engineering Nanomaterial Surfaces for Biomedical Applications. **Experimental Biology and Medicine**, 234, 1128-1139, 2009. <https://doi.org/10.3181/0904-MR-134>
102. ZHANG, J. X. J.; HOSHINO, K. **Optical Transducers: Optical Molecular Sensors and Optical Spectroscopy**. Molecular Sensors and Nanodevices. Principles, Designs and Applications in Biomedical Engineering, Chapter 5, 233–320, 2014. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-7631-3.00005-3>