

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Faculdade de Medicina**

**AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DO IRMA PARA  
DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS VASOATIVOS  
(ANP E BNP) EM SANGUE FETAL**

**Erika Milhomens Brescia**

**Belo Horizonte-MG**  
**2006**

**Erika Milhomens Brescia**

# **AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DO IRMA PARA DOSAGEM DOS PEPTÍDEOS VASOATIVOS (ANP E BNP) EM SANGUE FETAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Saúde da Mulher.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral.

Faculdade de Medicina da UFMG

Belo Horizonte-MG

2006

Aos meus pais, com muito amor,  
por tudo o que eles representam na minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Meus eternos agradecimentos ao meu orientador Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral, pela oportunidade, pelo exemplo e por todo o conhecimento passado.

Ao Prof. Dr. Henrique Vitor Leite, que realizou junto com o Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral a coleta de todas amostras e pela sua disponibilidade sempre.

À Dra. Zilma Nogueira Reis, pela enorme paciência e ajuda em vários momentos, principalmente com a estatística, e por fornecer o banco de dados.

À mestrande Jacqueline Braga Pereira Dantas, pelo carinho, amizade e por realizar a dosagem dos peptídeos.

À Prof. Dra. Adelina Martha dos Reis, que cedeu o laboratório para a realização das dosagens.

À Dra. Eura Martins Lage, pelo exemplo de dedicação e pela atenção a mim dispensada.

A todos os membros do CEMEFÉ que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste estudo.

À Cris, pelo incentivo, Tony, pelo amor e compreensão, amigos e familiares, pelo apoio sempre.

Ao CNPq, cuja bolsa possibilitou chegar até o final.

“O que sabemos é uma gota.  
O que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton (1643-1727)

## RESUMO

Para avaliar a técnica do IRMA (ensaio imunorradiométrico) na dosagem dos peptídeos vasoativos - ANP e BNP - em sangue fetal, realizou-se um estudo descritivo transversal, no qual foram incluídas 17 gestantes com idade gestacional entre 23 e 33 semanas. Todas haviam sido encaminhadas ao Centro de Medicina Fetal (CEMEFE) do Hospital das Clínicas (HC) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) em 2002, com indicação de cordocentese para realização de exames tradicionais, como hematimetria (em mães isoimunizadas) e cariótipos de fetos malformados, além de transfusão intra-uterina. As gestantes assinaram o termo de concordância em participar do estudo antes de serem incluídas. A coleta da amostra sanguínea fetal foi realizada pela equipe do CEMEFÉ por meio de cordocentese, e obtida da veia do cordão umbilical dos fetos. O volume de sangue retirado, variando entre 1 e 2ml, foi colocado em tubos Vacutainer® contendo EDTA (ácido etilenodiaminotetracético). A amostra de sangue fetal foi encaminhada ao Laboratório de Medicina Fetal do CEMEFÉ para ser centrifugada (10 minutos a 4.000 rpm, a 4°C). O plasma obtido foi acondicionado em tubo de *ependorf* de 2ml e em seguida armazenado em nitrogênio líquido a -196°C. Para realizar as dosagens do ANP e do BNP, foram utilizados *kits* da marca SHIONOGI & Co. Ltd., Osaka-Japan. As dosagens foram realizadas no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. O valor mínimo de ANP encontrado foi 26pg/ml e o máximo 655,2pg/ml. Já as concentrações do BNP variaram entre 11,9pg/ml e 284,9pg/ml. Nos fetos que apresentaram níveis de hemoglobina (Hb) menor que 10g/dl, considerados anêmicos, a média da Hb fetal foi 6,56g/dl, enquanto nos fetos não anêmicos (Hb  $\geq$  10g/dl) o valor médio de Hb fetal encontrado foi 12,56g/dl. Não se verificou associação entre os níveis de Hb pré transfusão intra-uterina (TIU) e o ANP ( $p=0,491$ ). Já o BNP mostrou correlação positiva com os valores de Hb fetais ( $p=0,010$ ). Os resultados encontrados mostraram que a técnica do IRMA é confiável para dosar os peptídeos vasoativos (ANP e BNP) em sangue fetal.

Palavras-chave: Peptídeos vasoativos ANP e BNP. Sangue fetal. IRMA.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adreno-corticotrófico
ANF	<i>Atrial natriuretic factor</i> (fator atrial natriurético)
ANP	<i>Atrial natriuretic peptide</i> (peptídeo atrial natriurético)
BNP	<i>Brain natriuretic peptide</i> (peptídeo natriurético tipo-B ou peptídeo cerebral natriurético)
CEMEFE	Centro de Medicina Fetal
CNH	Hormônio natriurético cardíaco
CNP	<i>C-type natriuretic peptide</i> (peptídeo natriurético tipo-C)
COEP	Comitê Ético de Pesquisa em Humanos
ECL	Eletroquimiluminescência
ECLIA	Imunoensaio por eletroquimiluminescência
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
GC	Guanilato ciclase
GMPc	<i>Cyclic guanosina monophosphate</i> (Guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica)
HAC	Hipertensão arterial crônica
Hb	Hemoglobina
HC	Hospital das Clínicas
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
I <sup>125</sup>	Radioisótopo iodo 125
IG	Idade gestacional
IRMA	Ensaio imunorradiométrico
MEIA	Ensaio imunoenzimático por micropartículas
NPR	<i>Natriuretic peptide receptor</i> (Receptor de peptídeo natriurético)
proANP	<i>Pro-atrial natriuretic peptide</i> (Pro-peptídeo atrial natriurético)
proBNP	<i>Pro-brain natriuretic peptide</i> (Pró-peptídeo natriurético tipo B ou Pro-peptídeo cerebral natriurético)
PROBRAL	Programa Brasil-Alemanha
Rh	<i>Rhesus</i>
RNA <sub>m</sub>	<i>Messenger ribonucleic acid</i> (RNA mensageiro)
RIE	Radioimunoensaio
rpm	Rotações por minuto
SISNEP	Sistema Nacional de Ética em Pesquisa
SNC	Sistema nervoso central
TIU	Transfusão intra-uterina
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCM	Volume corpuscular médio

$\alpha$ -hANP       $\alpha$ -polipeptídeo atrial natriurético humano

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### Figuras

Figura 1 – Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos humanos.....	20
Figura 2 – Síntese do ANP humano.....	22
Figura 3 – Síntese do BNP humano.....	23
Figura 4 – Seletividade dos receptores do sistema de peptídeos natriuréticos.....	29
Figura 5 – Ações do ANP nas células-alvo.....	30
Figura 6 – Comparação entre o sistema de peptídeos em embriões (esquerda) e em adultos (direita).....	41
Figura 7 – Princípio do método do radioimunoensaio de duplo anticorpo.....	50
Figura 8 – Foto tirada pelo aparelho de ultra-som durante a cordocentese .....	63
Figura 9 – Desenho da técnica IRMA.....	65

### Gráficos

Gráfico 1 – Distribuição das gestantes de acordo com a idade gestacional (em semanas).....	58
Gráfico 2 – Distribuição das gestantes de acordo com a paridade.....	59
Gráfico 3 – Distribuição das gestantes por idade (em anos).....	60
Gráfico 4 – Distribuição dos níveis sanguíneos fetais do ANP (pg/ml)....	70
Gráfico 5 – Distribuição dos níveis sanguíneos fetais do BNP (pg/ml)....	71
Gráfico 6 – Descrição dos fetos quanto à presença ou ausência de anemia fetal (Hb <10 g/dl).....	72
Gráfico 7 – Correlação entre níveis de Hb pré-TIU e ANP no sangue fetal (p=0,491).....	73
Gráfico 8 – Correlação entre níveis de Hb pré-TIU e BNP no sangue fetal (p=0,010).....	74



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

### Quadros

Quadro 1 – Situações em que ocorre a liberação de ANP.....	25
Quadro 2 – Vantagens relativas de ensaios de ANB / BNP e NT-proANP/ NT-proBNP.....	47

### Tabelas

Tabela 1 – Distribuição das gestantes por idade gestacional (em semanas).....	57
Tabela 2 – Caracterização das gestantes de acordo com a idade gestacional (em semanas).....	58
Tabela 3 – Distribuição das gestantes de acordo com a paridade.....	59
Tabela 4 – Caracterização das gestantes de acordo com a paridade.....	59
Tabela 5 – Distribuição das gestantes de acordo com a idade (em anos)..	60
Tabela 6 – Caracterização das gestantes de acordo com a idade (em anos).....	60
Tabela 7 – Descrição das pacientes e fetos de acordo com a idade, paridade, Idade gestacional e hemoglobina pré-TIU.....	61
Tabela 8 – Descrição das dosagens sanguíneas fetais de ANP (pg/ml)....	70
Tabela 9 – Descrição das dosagens sanguíneas fetais de BNP (pg/ml)....	71

# SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Os peptídeos natriuréticos ANP e BNP.....	17
2.1.1 Histórico.....	17
2.1.2 Bioquímica e fisiologia dos peptídeos natriuréticos.....	18
2.1.2.1 Estrutura dos peptídeos e forma circulante.....	18
2.1.2.2 Síntese.....	20
2.1.2.3 Secreção.....	23
2.1.2.4 Distribuição tecidual e expressão gênica.....	26
2.1.2.5 Receptores.....	27
2.1.2.6 Ações biológicas dos peptídeos natriuréticos.....	32
2.2 Peptídeos natriuréticos no plasma fetal.....	35
2.2.1 Concentrações fetais dos peptídeos natriuréticos.....	37
2.2.2 Secreção e clearance dos peptídeos natriuréticos no feto.....	40
2.2.3 Expressão dos peptídeos natriuréticos no coração fetal.....	43
2.3 Métodos laboratoriais de dosagem dos peptídeos natriuréticos:	
ANP, BNP.....	44
2.3.1 Princípio das técnicas de dosagem dos peptídeos natriuréticos.....	49
3 OBJETIVOS.....	53
4 PACIENTES E MÉTODOS.....	55
4.1 Pacientes.....	56
4.1.1 Caracterização das gestantes estudadas.....	57
4.1.2 Critérios de inclusão.....	61
4.1.3 Critérios de exclusão.....	61
4.2 Métodos.....	62
4.2.1 Cordocentese - técnica de coleta do sangue fetal.....	62
4.2.2 Técnica de processamento e armazenamento do sangue fetal.....	64
4.2.3 Técnica de dosagem dos peptídeos ANP e BNP pelo método	
IRMA (ensaio imunoradiométrico).....	64
4.3 Metodologia Estatística.....	64
4.3.1 Tipo de estudo.....	64
4.3.2 Análise estatística.....	64
5 RESULTADOS.....	68
5.1 Grupo de estudo.....	69
5.2 Descrição das dosagens sanguíneas fetais de ANP.....	69
5.3 Descrição das dosagens sanguíneas fetais de BNP.....	71
5.4 Descrição dos fetos segundo presença ou ausência de anemia fetal	

(Hb <10g/dl).....	72
5.5 Correlação entre níveis de Hb e ANP no sangue fetal.....	73
5.6 Correlação entre níveis de Hb e BNP no sangue fetal.....	74
6 COMENTÁRIOS.....	75
7 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS.....	82
APÊNDICE E ANEXO.....	91

# **1 INTRODUÇÃO**

Na década de 80, um trabalho apresentou grande avanço no entendimento dos fluidos corporais. De Bold *et al.* (1981) verificaram atividade diurética, natriurética e vasodepressora induzidas pela infusão de extratos de tecido atrial em ratos. Em 1984, o peptídeo atrial natriurético (ANP) foi apontado como o primeiro peptídeo da família dos hormônios natriuréticos cardíacos e em 1988 o peptídeo natriurético tipo-B (BNP) foi isolado no cérebro de porcos. Desde então, eles têm sido muito estudados.

O ANP e o BNP são peptídeos vasoativos encontrados em animais e humanos adultos. Após a verificação de que essas substâncias estão presentes também durante o desenvolvimento dos indivíduos, cresceu na comunidade científica o interesse pelos peptídeos vasoativos fetais, visando ao melhor entendimento da fisiologia fetal. Esse conhecimento auxilia na compreensão de doenças que apresentam alterações nas concentrações dos mesmos.

Compartilhando desse interesse universal em torno dos peptídeos vasoativos, o CEMEF (Centro de Medicina Fetal) do Hospital das Clínicas da UFMG e o curso de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da UFMG iniciaram, em 1999, uma linha de pesquisa para estudo dos peptídeos vasoativos (ANP e BNP) durante gestações complicadas por pré-eclampsia. Os primeiros trabalhos foram realizados junto com um grupo de pesquisadores da Alemanha – Programa Brasil-Alemanha (projeto PROBRAL). A partir daí, várias teses e dissertações foram desenvolvidas no serviço.

O primeiro trabalho do curso de Pós-graduação realizado dentro dessa nova linha de pesquisa foi a tese da Dra Zilma Silveira Nogueira Reis em 2001. Em seguida, vieram a tese da Dra. Aurora Silva Oliveira (2002), a dissertação da Dra. Juliana Barra (2002) e a tese da Dra Gláucia Menezes (2002). Nesse mesmo ano, 2002, em dissertação de mestrado, o Dr. Mário Dias Corrêa Júnior foi o primeiro a avaliar as concentrações de ANP e BNP em fetos. Todas as dosagens do ANP e do BNP realizadas até então, utilizaram a técnica do radioimunoensaio (RIE).

Devido à necessidade de um volume relativamente grande, aproximadamente 10ml de sangue para realizar o RIE, constatou-se a importância de um novo método de dosagem que apresentasse a mesma confiabilidade no resultado, porém que utilizasse menor quantidade de sangue fetal, já que esse volume é muito representativo em relação à volemia total do feto.

Assim surgiu o interesse em avaliar o método IRMA (ensaio imunoradiométrico), técnica já conhecida para dosagem dos peptídeos vasoativos em adultos, para dosar os peptídeos vasoativos fetais.

# **2 REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 Os peptídeos natriuréticos

### 2.1.1 Histórico

Na década de 50, era conhecida a presença de grânulos nos cardiomiócitos de átrios e ventrículos e sabia-se que eles eram diferentes entre as espécies. Em 1956, Kisch mostrou existir diferença em grânulos presentes em átrios e ventrículos do mesmo coração, sugerindo que as variações na forma e no tamanho significariam diferenças em suas funções (KISCH, 1956). Entretanto, apenas muitos anos depois foi possível compreender a função desses grânulos, quando DE BOLD *et al.*, a partir da infusão de extratos de tecido atrial em ratos, verificaram efeito natriurético, diurético e vasodepressor causado pela infusão. Assim, foi dado o primeiro passo para o entendimento da fisiologia dos nossos fluidos corporais (DE BOLD *et al.*, 1981).

Somente três anos após a descoberta de De Bold *et al.* foi isolado o primeiro membro da família de peptídeos natriuréticos, o ANP, inicialmente conhecido como fator atrial natriurético (ANF) - (SEIDMAN *et al.*, 1984). Seidman *et al.* verificaram na molécula precursora do ANF características típicas de hormônios sugerindo que se tratava de um hormônio cardíaco. Uma nova função atrial foi então postulada (endócrina). Nesse mesmo ano o ANF foi purificado, seqüenciado e nomeado  $\alpha$ -polipeptídeo atrial natriurético humano ( $\alpha$ -hANP) - (KANGAWA; MATSUO, 1984). Em 1988, Sudoh *et al.* identificaram no cérebro de porcos um novo peptídeo da família de peptídeos natriuréticos que, por esta razão, passou a se chamar peptídeo natriurético cerebral ou peptídeo natriurético



tipo-B (BNP). E em 1990 o terceiro membro da família foi então identificado e nomeado peptídeo natriurético tipo-C (CNP) - (SUDOH *et al.*, 1990).

Desde então a família dos peptídeos natriuréticos tem sido muito estudada, pois eles suprem uma função vital na regulação cardiovascular, atuando como reguladores da pressão sanguínea e homeostases de fluidos corporais através de seus efeitos diurético, natriurético e vasodilatador (ESPINER *et al.*, 1995; RUBATTU; VOLPE, 2001).

## 2.1.2 Bioquímica e fisiologia dos peptídeos natriuréticos

### 2.1.2.1 Estrutura dos peptídeos e forma circulante

O peptídeo atrial natriurético (ANP), o peptídeo natriurético tipo-B (BNP), o peptídeo natriurético tipo-C (CNP) e outros peptídeos derivados da porção N-terminal da cadeia peptídica do proANP e proBNP são hormônios natriuréticos cardíacos (CNHs) e fazem parte da família de peptídeos natriuréticos (CLÉRICO; DEL RY; GIANNESI, 2000).

Esse grupo de peptídeos é estruturalmente semelhante, mas geneticamente distintos. O ANP e o BNP são de origem cardíaca e o CNP de origem endotelial (RUSKOAHO, 2003). Os três conservam alguns aminoácidos através dos membros da família, como mostrado em destaque, na parte escura, na FIG. 1. Diferem em apenas seis dos 17 aminoácidos que formam a estrutura em forma de

anel presente em cada um deles. São diferentes também no tamanho, sendo 28, 32 e 22 aminoácidos em cada um, respectivamente (RUSKOHAI, 1992; YANDLE, 1994).

A principal forma biologicamente ativa do peptídeo atrial natriurético em humanos é composta de 28 aminoácidos, ANP (99-126). Outros nomes comumente usados na literatura são: ANP;  $\alpha$ -ANP; ANP (1-28). Sua base estrutural é formada por uma porção carboxiterminal, outra aminoterminal e um anel com 17 aminoácidos fechado por uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína. A seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies. O ANP de humanos, porcinos, caninos, bovinos e ovinos possui resíduo metionina na posição 110, enquanto o dos coelhos, ratos e camundongos possuem resíduo leucina na mesma posição (YANDLE, 1994).

O peptídeo natriurético tipo-B, em sua forma circulante, é composto de 32 aminoácidos, BNP (77-108), conhecido como BNP-32 e, assim como o ANP, é estruturalmente formado por uma porção carboxiterminal, outra aminoterminal e um anel com 17 aminoácidos fechado por uma ponte dissulfeto entre dois resíduos de cisteína (RUSKOHAI, 1992; YANDLE, 1994). Já a variabilidade da seqüência de aminoácidos pode ser grande entre as espécies (YANDLE, 1994). Foi inicialmente identificado no cérebro de porco (SUDOH *et al.*, 1988), mas outros estudos já mostraram que os níveis de BNP no coração são muito maiores (HOSODA *et al.*, 1991).

O peptídeo natriurético tipo-C, composto de 22 aminoácidos, CNP (82-103), é conhecido como CNP-22 e possui o mesmo anel com 17 aminoácidos presente

nos outros dois membros da família. Difere-se do ANP e do BNP por não possuir uma porção carboxiterminal. Assim como no ANP, sua seqüência de aminoácidos é altamente conservada entre as espécies. O CNP-22 é idêntico em porcos, ratos e humanos. Dos três peptídeos, é o mais prevalente no sistema nervoso central e o menos presente no coração (ESPINER *et al.*, 1995; YANDLE, 1994).

Somente serão detalhados o ANP e o BNP, pois o CNP não foi objetivo do presente estudo.

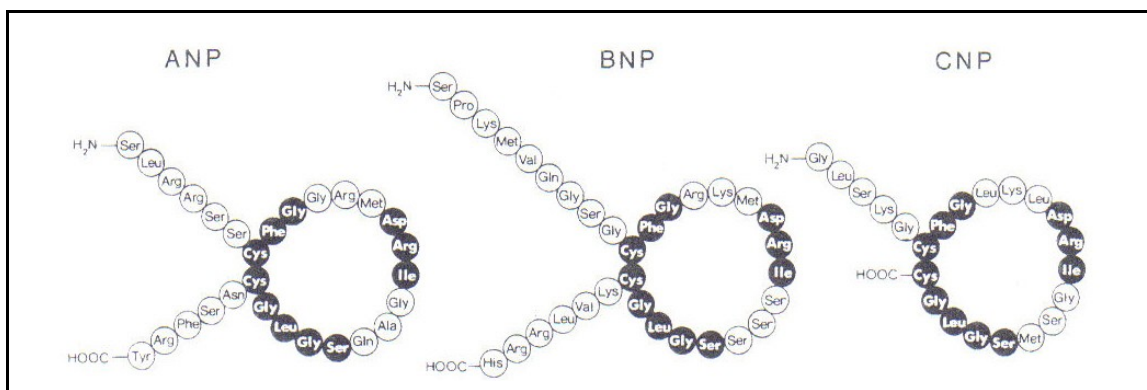


FIGURA 1 - Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos humanos.

FONTE: Espiner *et al.* (1995).

### 2.1.2.2 Síntese

Embora múltiplas formas de ANPs sejam produzidas, há evidências da existência de um único gene, o qual é altamente conservado nos genomas dos humanos, camundongos e ratos. Em humanos, esse gene responsável pela síntese do ANP é localizado no braço curto do cromossomo 1, banda p36,21. É composto de três exons e dois introns (YANG-FENG *et al.*, 1985), como pode ser visto na FIG. 2.

O ANP é sintetizado a partir de um grande precursor, um peptídeo de 151 aminoácidos, conhecido como prepro-ANP. Esse precursor, que contém uma seqüência sinal de 25 aminoácidos, é clivado e passa a ser composto de 126 aminoácidos. Essa nova seqüência é chamada de proANP e é a principal forma de ANP armazenada no átrio humano normal. Na maioria dos hormônios, a forma armazenada é a madura e não o pró-hormônio, como no ANP (YANDLE, 1994). O proANP permanece dentro de grânulos nos cardiócitos atriais até que receba algum estímulo e ocorra sua clivagem (ESPINER, 1994; RUSKOAHO, 2003).

A clivagem do proANP ocorre durante ou logo após a sua liberação (RUSKOAHO, 1992). Após ser clivado, libera um fragmento carboxi-terminal de 28 aminoácidos (ANP 99-126), que é sua principal forma ativa, e um outro fragmento de 98 aminoácidos (ANP 1-98) da porção aminoterminal em quantidades iguais (ESPINER, 1994; RUSKOAHO, 2003). Por essa razão, a dosagem do fragmento de ANP com 98 aminoácidos pode ser usada como estimativa da liberação de ANP pelo coração, já que o ANP (1-98) tem meia-vida aproximadamente 10 vezes maior no plasma que o ANP (2-5 minutos) e, conseqüentemente, tem 10-50 vezes a concentração plasmática do ANP. O ANP (1-98) também é mais estável em condições laboratoriais que o ANP (forma biologicamente ativa) - (RUSKOAHO, 2003).

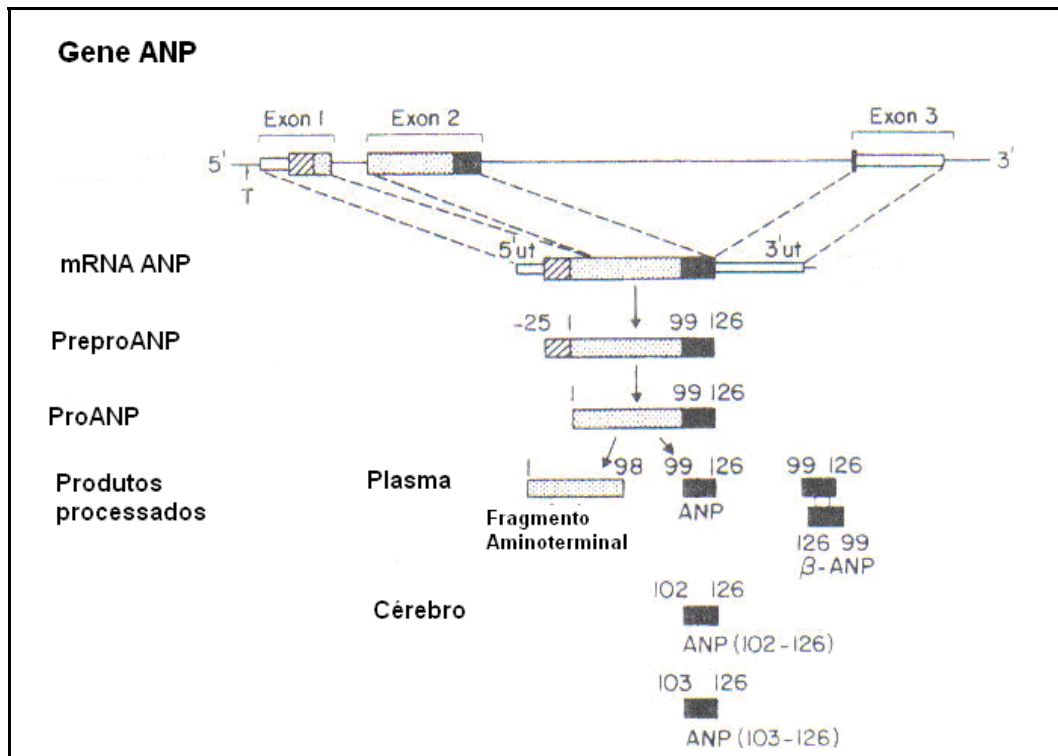


FIGURA 2 - Síntese do ANP humano.

NOTA: O exon 1 codifica a seqüência sinal de peptídeos (25 aminoácidos) e os primeiros 20 aminoácidos do proANP. O segundo exon codifica a maior parte do preproANP, com exceção da tirosina terminal, a qual é codificada pelo exon 3.

FONTE: Adaptado de Yandle (1994).

Semelhantemente ao ANP, o gene responsável pela síntese do BNP possui três exons e dois introns (FIG.3) e também está localizado no braço curto do cromossomo 1, banda p36,21.

O BNP também é sintetizado inicialmente como preproBNP, um precursor de 134 aminoácidos. Este é clivado e o sinal peptídico com 26 aminoácidos é removido, dando origem ao proBNP com 108 aminoácidos (YANDLE, 1994). Finalmente, o proBNP é clivado e libera o BNP, uma molécula com 32 aminoácidos (BNP-32) - (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998; NAKAO *et al.*, 1992a). Diferentemente do

ANP, o BNP em humanos não é armazenado na forma de pró-hormônio e sim em sua forma madura, o BNP-32 (ESPINER, *et al*; 1995).

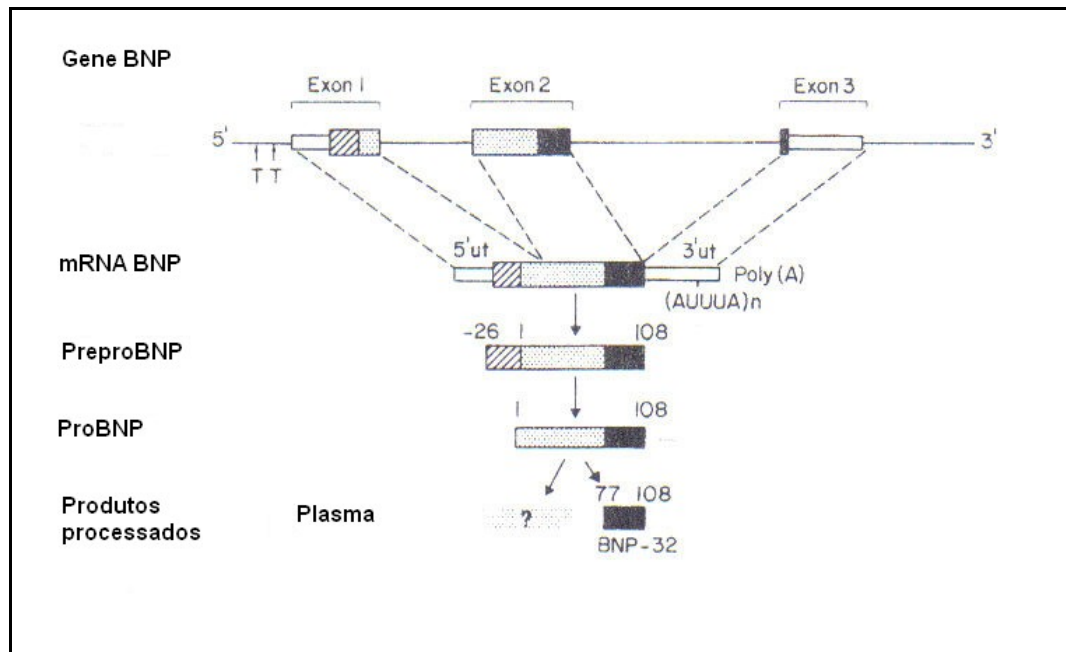


FIGURA 3 - Síntese do BNP humano.

FONTE: Adaptado de Yandle (1994).

### 2.1.2.3 Secreção

A função secretora do átrio cardíaco foi a primeira a ser descoberta, mas hoje já se sabe que ambos, átrios e ventrículos, sintetizam e secretam alguns hormônios peptídeos natriuréticos (MUKOYAMA *et al.*, 1991). Estudos *in vitro* também mostraram que o ANP, assim como o BNP, são secretados do tecido ventricular e que essa fonte contribui amplamente para os níveis circulantes dos mesmos. Em resposta ao estiramento induzido (pressão ventricular esquerda), o ANP

aumentou 81% e o BNP 150%, mostrando que também podem ser secretados em resposta a estiramento (KINNUNEM; VUOLTEENAHO; RUSKOAHO, 1993).

O ANP e o BNP são secretados normalmente em algumas situações fisiológicas e também em situações patogênicas, onde os níveis plasmáticos aparecem muito aumentados (ESPINER, 1994).

O ANP é produzido principalmente no átrio cardíaco (HOSODA *et al.*, 1991; SEIDMAN *et al.*, 1984) e armazenado em grânulos eletrodensos nos cardiócitos atriais (KISCH, 1956; JAMIESON; PALADE, 1964). Ao receber algum estímulo inicia-se então a sua clivagem (ESPINER, 1994; RUSKOAHO, 2003).

Os grânulos que armazenam o ANP, juntamente com o complexo de Golgi altamente desenvolvido, são a diferença morfológica mais evidente entre o volume de fenótipos de cardiócitos atrial e ventricular em mamíferos. O grânulo atrial específico armazena ambos, ANP e BNP (McGRATH; DeBOLD, 2005).

A liberação do ANP pode ser devida a causas mecânicas e humorais (BRENNER *et al.*, 1990). O aumento na tensão da parede atrial reflete-se no aumento do volume intravascular e é o principal estímulo para sua liberação (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998). Outro forte estímulo para a secreção de ANP é a taquicardia, principalmente atrial (ESPINER, 1994). Alguns hormônios e neurotransmissores, como endotelinas, vasopressina e catecolaminas, também estimulam diretamente sua secreção (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998).

O QUADRO 1 mostra algumas das situações fisiológicas e patogênicas em que o ANP pode ser secretado. Estudos *in vitro* indicam alguns fatores químicos que influenciam na liberação desses peptídeos (ESPINER, 1994; RUBATTU; VOLPE, 2001).

O ANP pode ser secretado também pelo ventrículo (KINNUNEM; VUOLTEENAHU; RUSKOAHO, 1993; RUSKOAHO, 1992) e pelo sistema nervoso central (SNC) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 1992).

#### QUADRO1

##### Situações em que ocorre a liberação de ANP

<p><b><i>Fisiológicas:</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Expansão do volume <ul style="list-style-type: none"> <li>Ingestão de líquido</li> <li>Aumento da ingestão de sódio</li> </ul> </li> <li>Imersão em água</li> <li>Posição supina</li> <li>Exercício físico</li> </ul> <p><b><i>Patogênicas:</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hipóxia</li> <li>Isquemia miocárdica</li> <li>Taquicardia</li> <li>Hipertensão arterial</li> <li>Insuficiência cardíaca congestiva</li> <li>Insuficiência renal crônica</li> </ul> <p><b><i>Químicas:</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>Fatores neurohumorais <ul style="list-style-type: none"> <li>Angiotensina II, endotelina I, catecolaminas, vasopressina, prostaglandina e glucocorticóides</li> </ul> </li> </ul>
---

Fonte: adaptado de Espiner (1994).



O BNP foi inicialmente identificado em cérebro de porcos (SUDOH *et al.*, 1988). Em humanos, está presente também no cérebro, mas principalmente no coração (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998), sendo o ventrículo a maior fonte de BNP cardíaco (77%) (HOSODA *et al.*, 1991).

O nível plasmático de BNP humano é marcadamente aumentado em distúrbios como insuficiência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, insuficiência renal crônica, hipertensão arterial (HOSODA *et al.*, 1991; YANDLE, 1994). Assim como em idosos, após dietas com maior ingestão de sódio e pacientes com cirrose com ascite (ESPINER, 1994).

Enquanto os níveis plasmáticos de BNP em humanos normais são consideravelmente menores que os de ANP, em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva eles aparecem muito aumentados e sempre superam os níveis de ANP (MUCOYAMA *et al.*, 1991). Neste caso o BNP é o principal peptídeo natriurético encontrado no plasma sanguíneo (HOSODA *et al.*, 1991). Sugerindo que o BNP, diferente do ANP, tem um potente papel patofisiológico na disfunção ventricular esquerda aguda (NAKAO *et al.*, 1992a).

#### 2.1.2 4 Distribuição tecidual e expressão gênica

O pró-hormônio precursor para cada um dos peptídeos é codificado por um gene diferente. A distribuição tecido-específica e a regulação de cada peptídeo também são únicas (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998).

A distribuição de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) do BNP e RNAm do ANP é claramente diferente no coração humano, especialmente entre átrio e ventrículo. Em corações normais, o nível de BNP RNAm encontrado no átrio direito > átrio esquerdo > ventrículo direito = ventrículo esquerdo. O nível de ANP RNAm no átrio direito = átrio esquerdo >> ventrículo direito = ventrículo esquerdo (HOSODA *et al.*, 1991).

Além do coração, a expressão gênica do ANP também acontece em tecidos extracardíacos como em células do arco aórtico, pulmão, cérebro, olho, adrenal, rim, trato gastrointestinal, timo, plexo coróide e corpos ciliares (RUSKOAHO, 1992), tuba uterina, útero, testículos, ovários (DOS REIS *et al.*, 1995; GUTKOSKA *et al.*, 1993; KIM *et al.*, 1997). Entretanto, sua expressão nesses tecidos é muito baixa, <2% do ANP atrial transcrito (ESPINER *et al.*, 1995).

A expressão extracardíaca do BNP ocorre na medula adrenal em bovinos e no cérebro de porcos (ESPINER *et al.*, 1995). Em humanos, o gene é expresso no cérebro e nas células amnióticas (ITOH *et al.*, 1993).

#### 2.1.2.5 Receptores

Os efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos são mediados por ligações dos peptídeos com receptores de membrana específicos (ESPINER *et al.*, 1995), localizados na superfície de células-alvo (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998). O anel presente na estrutura dos peptídeos natriuréticos (ANP, BNP, CNP) possui

grande homologia na seqüência de aminoácidos e é fundamental para a ligação dos peptídeos aos seus receptores (NAKAYAMA, 2005).

Três tipos de receptores dos peptídeos natriuréticos foram identificados em tecidos de mamíferos, NPR-A, NPR-B e NPR-C (receptor de clearance) - (KOOLER; GOEDDEL, 1992). Os receptores A e B possuem atividade guanilato ciclase e são mediadores das atividades biológicas dos peptídeos natriuréticos. O NPR-C não possui atividade guanilato ciclase e sua função é a remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação (YANDLE, 1994).

A seletividade dos receptores para cada um dos peptídeos natriuréticos foi avaliada em culturas celulares e mostrou que o NPR-C apresenta afinidade com os três peptídeos, maior com o ANP > CNP >BNP em humanos e ratos (FIG. 4). O receptor C permite também a ligação com vários outros análogos dos peptídeos natriuréticos. O NPR-A tem grande afinidade com o ANP e o BNP e pequena com o CNP. O NPR-B é mais seletivo para o CNP e este tem pouca afinidade com o ANP e o BNP (SUGA *et al.*, 1992). Nenhum receptor específico foi identificado para o BNP, sugerindo que o ANP e o BNP atuam através do receptor A, enquanto o CNP age via receptor B (ESPINER *et al.*, 1995). Em humanos, o BNP tem menos afinidade com o NPR-C que o ANP, o que pode explicar sua maior meia-vida na circulação (WILKINS; REDONDO; BROWN, 1997). A descoberta sobre a seletividade dos NPRs facilitou o entendimento do sistema de peptídeos natriuréticos (SUGA *et al.*, 1992).

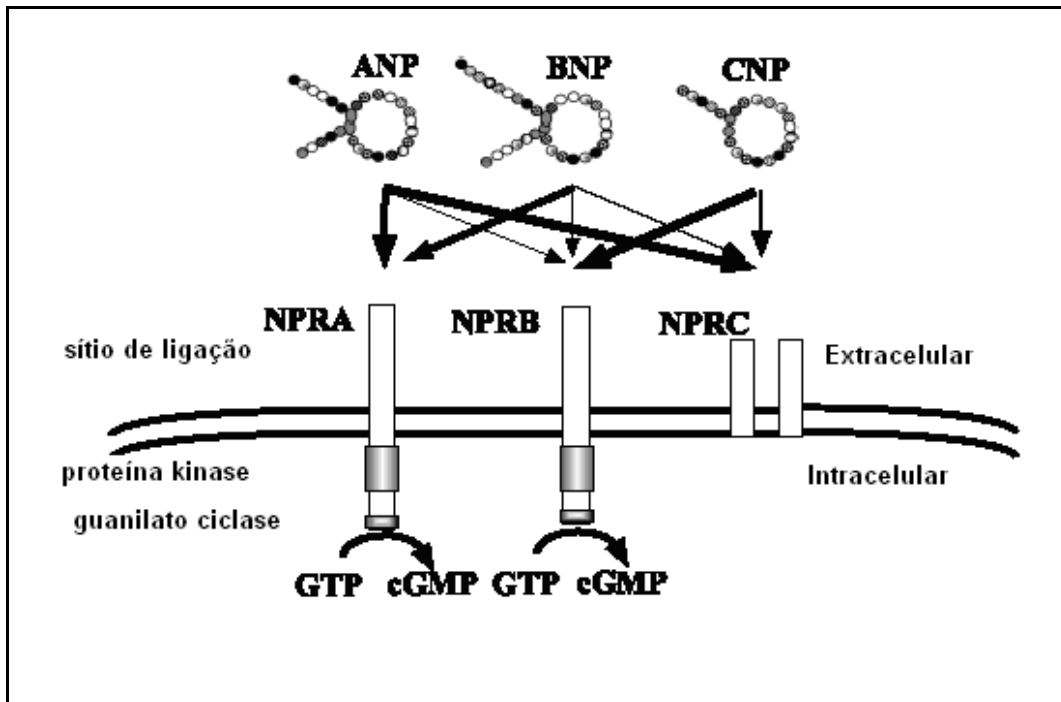


FIGURA 4 - Seletividade dos receptores do sistema de peptídeos natriuréticos.

FONTE: Adaptado de Nakayama (2005).

Os receptores A e B, que possuem atividade guanilato ciclase (GC), são compostos de uma parte extracelular, uma parte intracelular e uma transmembrana única. A ligação entre as regiões intracelular e extracelular é feita através do segmento de membrana (FIG. 5) (WILKINS; REDONDO; BROWN, 1997). O receptor C também possui transmembrana separando o sítio extracelular do sítio citoplasmático (NAKAO *et al.*, 1992b), mas falta a parte intracelular (WILKINS; REDONDO; BROWN, 1997). A interação dos peptídeos natriuréticos aos seus receptores ativa a guanilato ciclase, conduzindo ao aumento de GMPc (guanosina 3', 5'-monofosfato cíclica) - (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998).

Entre os receptores de peptídeos natriuréticos A e B existe uma semelhança estrutural com aproximadamente 44% de homologia no sítio de ligação extracelular. O sítio extracelular do NPR-C assemelha-se aproximadamente em 30% ao NPR-A e NPR-B (HOLCBERG *et al.*, 1995; KOLLER; GOEDDEL, 1992).

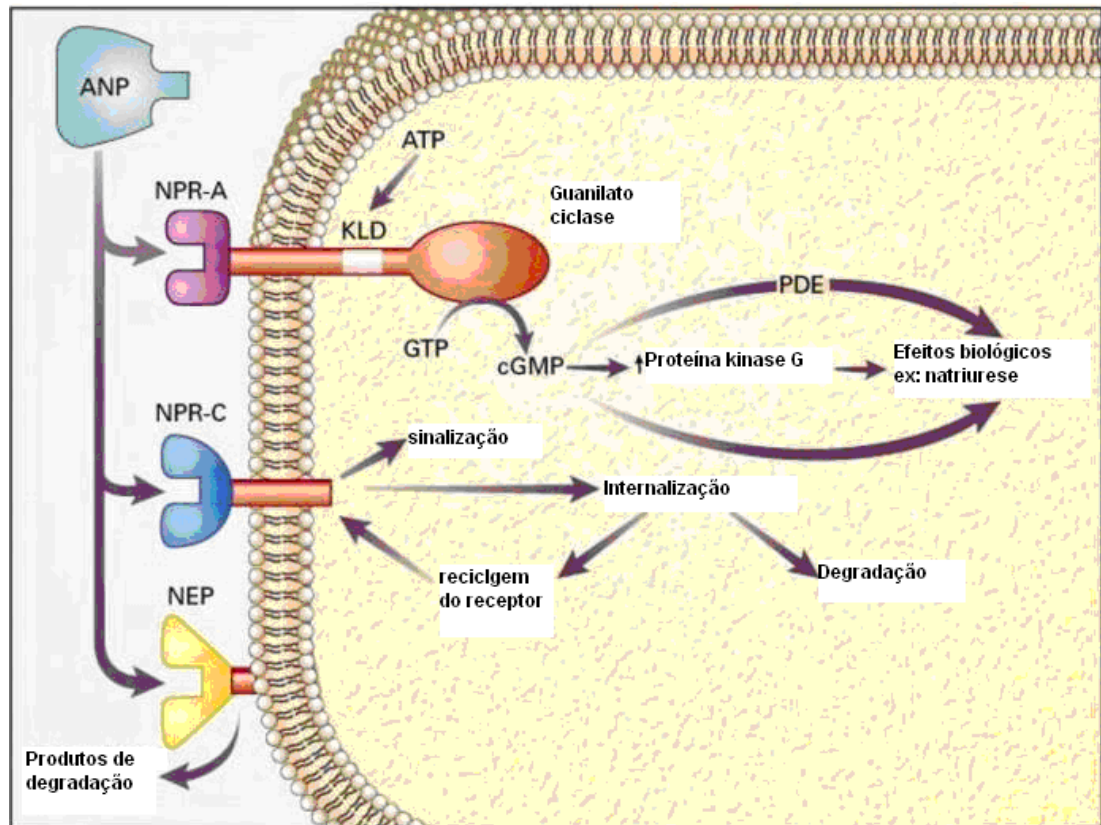


FIGURA 5 - Ações do ANP nas células-alvo.

FONTE: Adaptado de Levin, Gardner e Samson (1998).

O NPR-C está envolvido na eliminação dos peptídeos natriuréticos, que se ligam aos receptores, são internalizados e enzimaticamente degradados. Depois o receptor C retorna à superfície celular (MAACK *et al.*, 1987).

Endopeptidases neutras também são responsáveis por inativar os três peptídeos natriuréticos. A afinidade das endopeptidases é maior pelo CNP comparado ao ANP, já pelo BNP é bem menor do que pelos outros dois (KENNY *et al.*, 1993). As endopeptidases estão presentes nas células tubulares renais e células vasculares (LEVIN; GARDNER/ SAMSON, 1998). A combinação do NPR-C com as endopeptidases neutras na inativação do ANP resulta em um efeito muito maior que cada um separadamente (WILKINS; REDONDO; BROWN, 1997).

O NPR-A pode ser encontrado no pulmão, rim, adrenal, coração, tecido adiposo e olho (NAKAO *et al.*, 1992b), útero e tubas uterinas (DOS REIS *et al.*, 1995) sobrepondo em alguns a distribuição tecidual do NPR-B. O receptor B está presente no pulmão, rim e cérebro. O NPR-C se expressa vastamente no pulmão, rim, placenta e coração (NAKAO *et al.*, 1992b). Um estudo feito com macacos *rhesus* mostrou que o RNAm para o NPR-A é abundantemente expresso nos glomérulos renais, zona glomerulosa da adrenal, hipófise, cerebelo e coração, enquanto o RNAm do NPR-B foi identificado na medula adrenal, hipófise e cerebelo. O RNAm do NPR-C foi amplamente distribuído no rim, adrenal, coração e cérebro (WILCOX *et al.*, 1991) e tubas uterinas (DOS REIS *et al.*, 1995).

Assim como os hormônios maduros, uma forte homologia dos três receptores de peptídeos natriuréticos existe entre as espécies - mais de 95% na seqüência de NPR-C em humanos, ratos e bovinos (ESPINER *et al.*, 1995; NAKAO *et al.*, 1992b).

### 2.1.2.6 Ações biológicas dos peptídeos natriuréticos

O ANP e o BNP apresentam grande homologia estrutural e funcional (YANDLE, 1994), mas geneticamente são distintos (RUSKOAHO, 2003). O pró-hormônio precursor para cada um deles é codificado por um gene diferente. A distribuição tecido-específica e a regulação de cada peptídeo também são únicas (LEVIN; GARDNER; SAMSON, 1998). A distribuição de RNAm do ANP e RNAm do BNP é diferente no coração humano (HOSODA *et al.*, 1991).

Os efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos são mediados por ligações dos peptídeos com receptores de membrana específicos (ESPINER *et al.*, 1995). Já foram isolados receptores específicos dos peptídeos natriuréticos em vários tecidos, incluindo o coração, árvore vascular, rins, adrenais, pulmões e áreas específicas do sistema nervoso central (ESPINER, 1994).

As propriedades dos peptídeos natriuréticos são predominantemente mediadas pelo aumento direto da GMPc produzida pela ativação dos receptores guanilato ciclase (McGRATH; De BOLD, 2005).

As ações biológicas são influenciadas por algumas variáveis fisiológicas, como pressão arterial em repouso, *status* do sódio, postura e idade (ESPINER, 1994).

Os peptídeos natriuréticos ANP e BNP mostraram ser importantes reguladores dos sistemas renina-angiotensina-aldosterona e nervoso simpático, como hormônios que contrabalançam o aumento da pressão e do volume sanguíneos (McGRATH; De BOLD, 2005).

Entre os maiores efeitos do ANP em humanos estão a natriurese, aumento no hematócrito (como resultado de filtração capilar aumentada) e a inibição da secreção e/ou ação de outros sistemas hormonais, incluindo sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina e catecolaminas. Outros efeitos são: hipotensão e vasodilatação, entretanto, observados apenas em grandes infusões ou em casos de insuficiência cardíaca (ESPINER, 1994; WOODS, 2004).

As ações do ANP e do BNP na pressão sanguínea são muitas vezes mal compreendidas. Apesar de serem conhecidos como hormônios vasodilatadores, essa ação não é predominante em animais normais *in vivo*. Apenas em altas doses de infusão dos peptídeos ou em casos de falência cardíaca (WOODS, 2004).

Os mecanismos por meio dos quais o ANP reduz a pressão sanguínea são a diminuição do débito cardíaco, reduções na resistência vascular periférica e diminuição do volume intravascular (BRENNER *et al.*, 1990).

Nos rins, uma infusão de ANP induz a natriurese e diurese, acompanhada de aumentos de fosfato, cálcio, magnésio, cloreto, e excreção de GMPc (BRENNER *et al.*, 1990).

Uma variedade de ações hemodinâmicas atribuídas ao ANP já foi documentada em experimentos com animais e humanos. Esses efeitos vão desde ações na microcirculação até efeitos cardíacos centrais (diminuição do débito cardíaco), vasorrelaxamento arteriolar e efeitos no SNC autônomo (inibição de baroreceptores) - (ESPINER, 1994).



Em humanos normotensos e animais de experimentos, uma dose alta e única de ANP causa pequena e sustentada queda na pressão arterial média e pequeno aumento da taxa cardíaca (RICHARDS *et al.*, 1985). Esse efeito é provavelmente devido à ação direta no tônus vascular (vasorrelaxamento), também observado durante infusões intra-arteriais locais diretas do hormônio (BOLLI 1987).

Infusões contínuas com doses muito baixas de ANP apresentaram aumento de excreção de sódio e diminuição das pressões sanguíneas em humanos hipertensos, além de elevação da frequência cardíaca e do hematócrito, mostrando, assim, que o ANP em pequenas concentrações está intimamente envolvido na regulação do equilíbrio de sódio e na pressão sanguínea em humanos (JANSSEN *et al.*, 1989). Esses achados sugerem que variações fisiológicas do ANP têm importantes ações vasodepressoras *in vivo* se agirem por tempo prolongado (ESPINER, 1994).

Em humanos normais, a infusão de pequenas doses de ANP em curtos períodos leva à queda de renina e aldosterona (RICHARDS *et al.*, 1988), sem afetar os níveis de cortisol. A supressão da renina e aldosterona pode ser superada por grandes aumentos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ou angiotensina, ou por estimulação neurohumoral, como induzido por hipotensão ou hemorragia (ESPINER; RICHARD, 1989).

Infusões de ANP que inibem aldosterona também causam queda proporcional de renina e angiotensina. As respostas destas duas substâncias podem ser separadas; por exemplo, na insuficiência cardíaca congestiva, a aldosterona é mais inibida que a renina (SATIO, 1987).

Estudos em animais mostraram forte evidência de neurosecreção do ANP agindo via receptores específicos (NPR-A e possivelmente NPR-C), sugerindo sua participação na regulação cerebral de pressão sanguínea e homeostase de sódio (ESPINER, 1994).

Uma ação parácrina importante do ANP é a inibição da proliferação celular, como, por exemplo, nas células endoteliais, mesangiais e da musculatura lisa vascular. Isso sugere que o ANP regula o crescimento celular do sistema vascular (APPELL, 1992).

A variabilidade da seqüência de aminoácidos do BNP é maior entre as espécies do que o ANP (YANDLE, 1994). Por essa razão, a interpretação de dados cruzados entre as espécies exige mais cuidados (ESPINER, 1994).

Holmes *et al.* (1993) verificaram que em homens normais, duas horas de infusão de BNP (alcançando níveis semelhantes a leve insuficiência cardíaca) ativam a guanilato ciclase e têm efeito natriurético, inibem renina e adolterona e reduzem o volume plasmático. E sugeriram que o BNP e o ANP devem participar do controle homeostático de sódio e regulação da pressão sanguínea em humanos.

## 2.2 Peptídeos natriuréticos no plasma fetal

Em 1986, Yamaji *et al.* relataram a presença de ANP circulante em fetos humanos. O ANP encontrado no sangue de cordão umbilical e os maiores níveis

plasmáticos verificados no plasma arterial comparado ao plasma venoso sugeriram a secreção do ANP pelo tecido atrial fetal humano (ou outro tecido).

O ANP foi identificado a partir da nona semana de gestação. Durante o desenvolvimento do coração, aparece em maiores quantidades no átrio esquerdo e decresce no átrio direito, ventrículo direito e ventrículo esquerdo, respectivamente (TSUCHIMOCHI *et al.*, 1988). O BNP foi detectado no coração de fetos normais com 10 semanas de idade gestacional (HYETT *et al.*, 1996).

O sistema de peptídeos natriuréticos nos fetos tem sido descrito como um sistema endócrino duplo. Dois componentes, ANP e BNP, são especificamente regulados em condições patofisiológicas (WALTER; STEPAN; FABER, 2001; WALTER *et al.*, 2002).

Fetos de ratos responderam a aumentos na pressão intracardíaca com elevados níveis de ANP plasmático, assim como animais adultos, indicando um sistema funcional de peptídeos natriuréticos durante a vida fetal (WEI *et al.*, 1987).

A expressão de BNP e CNP foi demonstrada na decídua da placenta de camundongos (CAMERON *et al.*, 1996) e a expressão de ANP foi demonstrada na placenta humana, particularmente por células citotrofoblásticas (GRAHAM *et al.*, 1996).

Em sua tese de doutorado, Menezes (2002) determinou a presença de BNP na placenta humana utilizando a técnica de radioimunoensaio.

### 2.2.1 Concentrações fetais dos peptídeos natriuréticos

Alguns estudos mostraram que as concentrações de ANP em fetos de animais e humanos são maiores do que as maternas (MAKIKALLIO *et al.*, 2001; PANOS *et al.*, 1989; WALTER; STEPAN; FABER, 2001; WEI *et al.*, 1987).

As concentrações de BNP fetais encontradas também são maiores que as maternas (BAJORIA; WARD; CHATTERJEE, 2002; WALTER; STEPAN; FABER, 2001; WEI *et al.*, 1987). Um estudo realizado por LAURIA *et al.* (1996) mostrou o contrário, níveis de BNP materno maiores que os fetais.

A concentração de ANP no plasma fetal é maior que no plasma adulto. Como tem meia-vida curta no plasma, a concentração do peptídeo na circulação é mantida devido à alta taxa de produção endógena do ANP, o que revela a grande capacidade de produção e secreção de ANP pelo coração fetal (CHEUNG, 1995).

Desse modo, altas concentrações de peptídeos natriuréticos em fetos comparados aos adultos indicam que o sistema de peptídeos natriuréticos é importante no controle do volume cardíaco em fetos (WALTER; STEPAN; FABER, 2001).

Os níveis de ANP na circulação fetal não variam ao longo da gestação (BAJORIA; WARD; SOORANNA, 2001; KINGDON *et al.*, 1992; PANOS *et al.*, 1989; VILLE *et al.*, 1994;). No entanto outros dois estudos mostraram que os níveis de ANP se elevam ao longo da gestação em fetos de ovelhas. Esse fato está associado

provavelmente ao progressivo aumento da taxa cardíaca nos fetos, como em fetos maduros (BRACE; CHEUNG, 1987; CHEUNG; BRACE, 1988).

Em fetos normais, a expressão cardíaca do RNA mensageiro do ANP diminuiu com o avanço da gestação, enquanto no RNA mensageiro do BNP nenhuma mudança significativa foi percebida. Nos fetos trissômicos, a expressão de ambos, RNAm do ANP e do BNP, apresentou significativo aumento (HYETT *et al.*, 1996).

A concentração de ANP fetal dosado antes e imediatamente após uma transfusão sanguínea mostrou aumento significativo em resposta à expansão de volume sanguíneo, sugerindo que a liberação de ANP nos fetos exerce papel importante na homeostase de volume sanguíneo fetal (PANOS *et al.*, 1989).

Um outro resultado foi encontrado por Walter, Stepan e Faber (2001) em fetos isoimunizados, caracterizados por circulação hiperdinâmica, com velocidade de fluxo sanguíneo aumentado em veias e artérias, onde a concentração do ANP apareceu elevada, enquanto a do BNP não se alterou, quando comparados a fetos controles. No entanto, esses mesmos fetos isoimunizados, ao receberem transfusão intravascular (aumento agudo do volume cardíaco), levaram aumento significativo aos níveis plasmáticos de BNP e não de ANP, mostrando que os dois peptídeos respondem diferentemente a aumentos agudos ou constantes na sobrecarga de volume cardíaco.

As concentrações plasmáticas da porção aminoterminal de ANP e BNP (NT-proANP e NT-proBNP) em recém nascidos saudáveis mostraram forte aumento nos primeiros dias de vida, sugerindo que o ANP e o BNP desenvolvem papéis

fisiológicos na mudança da circulação fetal para neonatal. Os níveis desses peptídeos abaixam e se tornam estáveis após quatro e dois dias de vida, respectivamente (MIR *et al.*, 2003).

Em sua dissertação de mestrado, Corrêa Júnior (2002) verificou que as concentrações séricas do ANP não variam entre recém-nascidos de mães hipertensas e normotensas. E as concentrações séricas do BNP são maiores em recém-nascidos de mães hipertensas apenas quando fetos com crescimento intra-uterino restrito são incluídos na análise. Observou, ainda, que as concentrações séricas do ANP e do BNP fetais só são influenciadas significativamente pelo aumento da pressão arterial materna, quando esta leva à lesão placentária e ao desenvolvimento de crescimento intra-uterino restrito.

As concentrações do ANP na circulação fetal e em doenças fetais apresentam algumas contradições. Ville *et al.* (1994) mostraram níveis aumentados de ANP em fetos anêmicos, acidêmicos e hidróticos. Já Kingdom *et al.* (1989) referenciaram níveis aumentados de ANP após transfusão intravascular e Fisk *et al.* (1990) relataram níveis aumentados de ANP em fetos não hidróticos e níveis diminuídos de ANP em fetos hidróticos após transfusão.

Em um estudo realizado em 2002, Tsukahara *et al.* registraram, pela primeira vez, a interação existente entre os mediadores vasoativos e natriuréticos no cordão umbilical. Foram correlacionados os níveis de arginina vasopressina, endotelina I, adrenomedulina, ANP, BNP e óxido nítrico, dosados em sangue da veia do cordão na hora do parto e comparados aos níveis de adultos normais.

### 2.2.2 Secreção e clearance dos peptídeos natriuréticos no feto

Os peptídeos natriuréticos cardíacos são secretados durante o desenvolvimento em resposta a estímulos fisiológicos similares aos que os levam a ser secretados em adultos (CAMERON; ELLMERS, 2003). Alguns estudos em fetos de ovelhas mostraram que a secreção do ANP é estimulada em resposta ao aumento de volume, hiperosmolaridade (CHEUNG, 1995), hipóxia (CHEUNG, 1995; JOHNSON *et al.*, 1997) e por vasoconstritores como angiotensina II e fenilefrina (CAMERON; ELLMERS, 2003), vasopressina (WEI *et al.*, 1987) e endotelina (CHEUNG, 1995).

Altos níveis de ANP e BNP observados no coração fetal e a capacidade de responderem a estímulos de volume indicam que esse é um sistema de peptídeos funcional durante a gestação e deve ser importante na regulação da pressão sanguínea e equilíbrio (sódio/água) durante o desenvolvimento de embriões, assim como em adultos (FIG. 6) - (CAMERON; ELLEMRS, 2003).

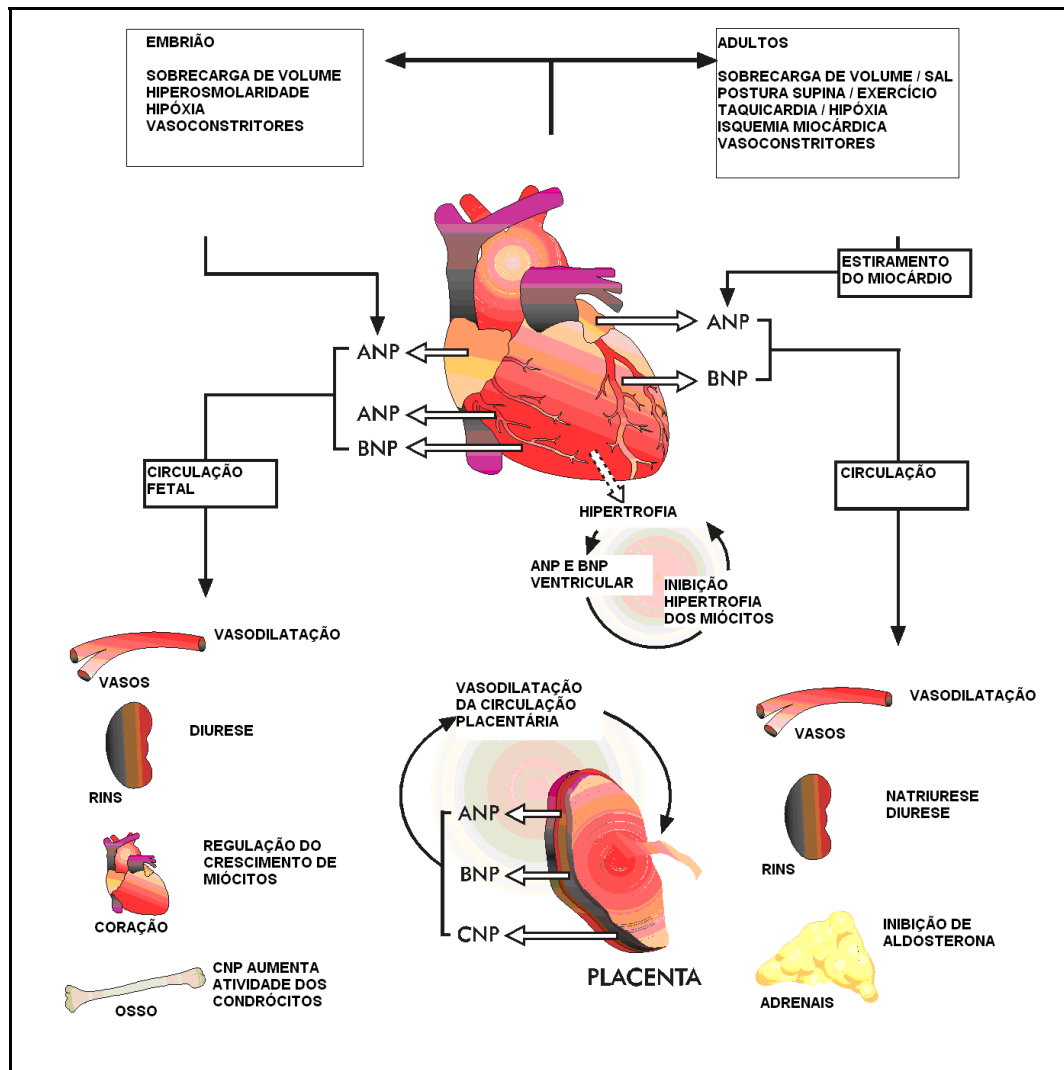


FIGURA 6 - Comparação entre o sistema de peptídeos em embriões (esquerda) e em adultos (direita).

FONTE: adaptado de Cameron e Ellmers (2003).

Semelhante à circulação em adultos, ANP e BNP respondem diferentemente a sobrecargas de volume cardíaco de curto (induzido por transfusão intra-uterina) e longo período (fetos com isoimunização *rhesus* - Rh) na circulação fetal. Os fetos com isoimunização Rh apresentam aumentados níveis de ANP; e o BNP não se



altera. Já na transfusão intravascular, apenas os níveis de BNP elevam-se significativamente, sugerindo que o ANP e o BNP constituem um sistema de peptídeos natriuréticos responsável pelas mudanças na pressão cardíaca (WALTER; STEPAN; FABER, 2001).

Durante o desenvolvimento, os peptídeos natriuréticos participam da regulação da pressão sanguínea e homeostase de fluidos corporais e modificam o crescimento e desenvolvimento de tecidos cardiovascular e ósseo (CAMERON; RICHARDS, 2002).

A remoção dos peptídeos natriuréticos da circulação ocorre através de ligação com o NPR-C. Eles são internalizados e enzimaticamente degradados. Uma outra forma de eliminação é pela ação de endopeptidases neutras (MAACK *et al.*, 1987). A inativação dos peptídeos se dá após a abertura da estrutura em forma de anel que os compõe (KENNY *et al.*, 1993).

WALTER *et al.* (2004) foram os primeiros a determinar concentrações de fragmentos aminoterminais de ANP e BNP e a atividade de endopeptidases em fetos humanos. As concentrações de NT-proANP no plasma fetal foram 11,7 vezes maiores que no plasma materno, enquanto as concentrações de ANP no feto foram apenas 1,8 vez maior que as maternas, indicando maior degradação do ANP na circulação fetal. Já o NT-proBNP e o BNP apresentaram concentrações duas vezes maiores nos fetos que no sangue materno. Os fetos com isoimunização Rh tiveram concentrações plasmáticas de NT-proBNP maiores que os controles, enquanto o BNP praticamente não se alterou,

revelando maior degradação do BNP que do NT-proBNP. Essa degradação não parece estar associada ao aumento na atividade de endopeptidases neutras.

### 2.2.3 Expressão dos peptídeos natriuréticos no coração fetal

No coração adulto, o átrio é o principal local de expressão do RNA mensageiro do ANP (HOSODA *et al.*, 1991; RUSKOAHO, 1992). No coração de fetos humanos, o nível de RNAm do ANP ventricular encontrado foi maior que no ventrículo do coração de controles adultos (GARDNER *et al.*, 1989). Os níveis de RNAm do ANP ventricular são um quinto dos níveis encontrados no átrio, comparados com ventrículos de adultos normais, nos quais os níveis de RNAm do ANP são 1% dos níveis encontrados nos átrios (ESPINER *et al.*, 1995). O ANP atrial é significativamente mais alto que o ANP ventricular durante o desenvolvimento fetal, indicando que, em fetos de mamíferos, o átrio é o tecido predominante de produção do ANP (WALTER *et al.*, 2002).

Entretanto, durante o desenvolvimento de roedores, foram encontrados níveis mais altos de expressão do ANP e do BNP nos ventrículos (WEI *et al.*, 1987; CAMERON *et al.*, 1996). Já em fetos de ovelhas, semelhantemente aos fetos humanos, houve maior expressão no átrio que no ventrículo durante a gestação (CHEUNG; ROBERTS, 1993). Os níveis de ANP e BNP em ventrículos fetais também são maiores que em ventrículos adultos (WEI *et al.*, 1987).

Nenhuma expressão de CNP foi detectada durante o desenvolvimento do coração em ratos e humanos (CAMERON *et al.*, 1996).

Esses estudos mostram que a contribuição de ANP do ventrículo de embriões é significativamente maior que a do ventrículo de adultos em todas as espécies estudadas. E em algumas o ventrículo é o local predominante de expressão do ANP e do BNP durante o desenvolvimento (CAMERON; RICHARDS, 2002).

Foi descrito, em fetos de ratos com 20 dias de gestação, nível muito alto de ANP circulante (WEI *et al.*, 1987), possivelmente associado a expandido volume de água no feto (CAMERON *et al.*, 1996).

Observações diárias da expressão de peptídeos natriuréticos durante a embriogênese em camundongos mostraram que o RNA mensageiro do ANP e do BNP aparecem por volta do oitavo/nono dias de gestação, apresentam grande pico nos níveis de RNAm no dia 12,5 e picos menores nos dias 14,5 e 16,5 pós-coito (CAMERON *et al.*, 1996). Isso significa que o ANP e o BNP influenciam na formação do coração (CAMERON; ELLMERS, 2003).

### 2.3 Métodos laboratoriais de dosagem dos peptídeos natriuréticos: ANP, BNP

Em 1985, Yamaji, Ishibashi e Takaku utilizaram um radioimunoensaio adequado para verificar se o ANF era um hormônio circulante em humanos. O resultado demonstrou que o ANF é um hormônio circulante e que é secretado em resposta à expansão do volume.

A primeira evidência de peptídeo natriurético fetal também foi verificada a partir da dosagem pelo método do radioimunoensaio (YAMAJI *et al.*, 1986).

Através de radioimunoensaio, verificou-se que durante o desenvolvimento do coração maior quantidade de ANP é encontrada no átrio esquerdo, seguido do átrio direito, ventrículo direito e ventrículo esquerdo, respectivamente (TSUCHIMOCHI *et al.*, 1988).

Mucoyama *et al.* (1991) usaram radioimunoensaio específico para BNP humano (hBNP), com anticorpo monoclonal e investigaram síntese, secreção e clearance, comparando o ANP em pacientes normais e com insuficiência cardíaca congestiva crônica.

O ANP é comumente dosado por radioimunoensaios (RIE). Entretanto, esse método apresenta alguns problemas, principalmente com o limite de detecção e precisão (CLERICO *et al.*, 1990; GUTKOWSKA *et al.*, 1987;). Um método de dosagem ideal para o ANP deve detectar apenas sua forma biologicamente ativa (ANP<sub>99-126</sub>) e não os precursores (proANP<sub>1-126</sub>, ) ou metabólitos (ANP<sub>124-126</sub>, ANP<sub>107-126</sub>, ANP<sub>112-126</sub>, etc.) ou outros peptídeos relatados da família (BNP, CNP) (ESPINER *et al.*, 1995; RUSKOAHO, 1992).

Dosagens do ANP plasmático realizadas através de ensaios imunorradiométricos (IRMA) mostraram melhor sensibilidade e precisão que os RIEs já relatados (LEWIS *et al.*, 1989; TATTERSAL *et al.*, 1990). Um dos motivos é que o IRMA não requer extração prévia ou purificação da amostra do plasma e, por esta razão, torna-se mais adequado que RIEs em ensaios de rotina das concentrações

plasmáticas fetais do ANP e BNP (CLERICO *et al.*, 1996, CLERICO; LEVARSI; MARIANI, 1999). Além disso, o IRMA não utiliza o ANP (ou BNP) marcado radioativamente como traçador e sim um anticorpo radioativo mais estável, o que reduz muito a instabilidade do traçador (problema já relatado em alguns RIEs) - (CLERICO; LEVARSI; MARIANI, 1999).

Em 1996, Clerico *et al.* avaliaram um *kit* de dosagem do ANP que utiliza a técnica do IRMA. Por meio do kit IRMA foram realizadas as dosagens das concentrações plasmáticas de ANP em pacientes saudáveis (n=59) e com insuficiência cardíaca (n=77). Os resultados foram similares aos relatados em outros ensaios imunorradiométricos e foram muito melhores que os conseguidos através de radioimunoensaios.

Teoricamente, seria mais fácil um método de imunoensaio para NT-proANP e NT-proBNP devido às suas maiores concentrações plasmáticas, quando comparadas às do ANP e BNP, respectivamente (CLERICO; DEL RY; GIANNESI, 2000; WEI *et al.*, 1993). Baseados nessas informações, em 1998 Numata desenvolveu um método mais sensível e rápido para dosagem do NT-proANP em plasma, o IRMA. Essa nova técnica, além de consumir menos tempo para dosagem comparada aos radioimunoensaios previamente descritos, apresentou também mais sensibilidade e, diferentemente do ANP, não exigiu condições especiais para coleta e armazenamento das amostras.

Por outro lado, um imunoensaio para NT-proANP ou NT-proBNP pode sofrer a interferência de alguns problemas analíticos, principalmente relativos a variações das especificidades dos ensaios. Por esta razão, resultados diferentes são

produzidos por métodos diferentes (CLERICO; DEL RY; GIANNESSEI, 2000). As divergências encontradas nos resultados dos métodos utilizados afetam a precisão de diagnóstico dos ensaios, o que dificulta a distinção entre as pessoas com e sem doenças cardíacas (CLERICO; DEL RY; GIANNESSEI, 2000; HAMMERER-LERCHER *et al.*, 2001; PRONTERA *et al.*, 2003). O QUADRO 2 apresenta as vantagens de dosarem-se o ANP e o BNP ou NT-proANP e NT-proBNP.

#### QUADRO 2

Vantagens relativas de ensaios de ANP / BNP e NT-proANP / NT-proBNP

<b>ANP / BNP</b>	<b>NT-proANP / NT-proBNP</b>
Correlação próxima entre atividades hormonais e imunológicas.	Concentrações circulantes maiores e mais estáveis.
Melhor correlação com condições clínicas ou fisiológicas após agudas alterações hemodinâmicas.	Menor degradação <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> .

Fonte: Clerico e Emdin (2004).

Alguns trabalhos foram realizados com o objetivo de comparar diferentes técnicas de dosagem dos peptídeos natriuréticos.

Em 2005, Clerico *et al.* compararam quatro diferentes métodos de dosagem do BNP: o IRMA (ensaio imunorradiométrico), dois sistemas de imunoensaios automatizados; o MEIA (ensaio imunoenzimático por micropartículas) e o ADVIA (quimioluminescência) e o Triage BNP Test (imunoensaio de fluorescência). Avaliaram também um método totalmente automatizado que utiliza a tecnologia

de detecção por eletroquimiluminescência (ECL) para o NT-proBNP, ELECSYS® 2010. Os resultados obtidos a partir do MEIA foram significativamente diferentes dos outros. Os métodos que apresentaram melhor concordância nos resultados foram o IRMA e o ADVIA. Os quatro foram capazes de diferenciar pessoas saudáveis dos pacientes com diferentes graus de falência cardíaca, assim como classificá-los (leves e graves). A eletroquimiluminescência para NT-proBNP mostrou melhor resultado quando comparada aos outros imunoenaios.

Um outro estudo comparou os resultados do método ECLIA (imunoenensaio por eletroquimiluminescência) para NT-proBNP com os resultados do IRMA para ANP e BNP em pessoas saudáveis e em pacientes com doença cardíaca. O ensaio com o NT-proBNP apresentou melhor performance em diferenciar indivíduos saudáveis de pacientes doentes do que os ensaios de ANP e BNP e o melhor desempenho foi mais evidente nas que apresentaram apenas insuficiência cardíaca branda (PRONTERA *et al.*, 2003). Já em outro trabalho, onde foi usado um imunoenensaio diferente para o NT-proBNP e NT-proANP e um ensaio imunorradiométrico para o BNP, não sendo verificada diferença nos resultados clínicos obtidos com os ensaios de NT-proBNP e BNP. Isso evidenciou que a performance do imunoenensaio escolhido é um ponto importante na determinação dos resultados de uma comparação entre diferentes ensaios para CNH (HAMMERER-LERCHER *et al.*, 2001).

O BNP e o NT-proBNP são ferramentas que ajudam como marcadores da função cardíaca, principalmente de alterações da função ventricular esquerda. Os dois são secretados na circulação em iguais quantidades, mas existe diferença entre seus níveis circulantes devido a distintos receptores e mecanismos de clearance.

O NT-proBNP tem concentração quatro a seis vezes maior que o BNP. Nenhum deles apresenta vantagem clínica relevante. Ambos os peptídeos mostraram valor equivalente como marcadores prognósticos e diagnósticos, apesar da experiência clínica ser maior com o BNP (PFISTER; SCHNEIDER, 2004).

### 2.3.1 Princípio das técnicas de dosagem dos peptídeos natriuréticos

Em 1960, Berson e Yalow introduziram os sistemas de análise por saturação utilizando a medida radioativa, o que tornou possível a dosagem de substâncias com baixíssimas concentrações (nano e picogramas). Surgiu, assim, a possibilidade de determinar qualquer tipo de molécula biológica, desde que se consiga obter um receptor específico e que a molécula biológica possa, de algum modo, ser marcada. Dependendo do tipo de receptor, a técnica de saturação pode ser imunoensaio, quando o receptor específico é um anticorpo ou competição protéica, quando o receptor é uma proteína transportadora específica. E dependendo do tipo de marcação que a molécula biológica receber, os imunoensaios podem ser radioimunoensaio (RIE), quando a marcação é feita com isótopos radioativos ou enzima-imunoensaio, quando a marcação é feita com enzimas (*apud* MOURA *et al.*, 1998).

O RIE consiste na introdução do hormônio marcado com um traçador (radioisótopo) em uma reação imunológica que se dá com o hormônio natural, sem o isótopo em sua molécula, que nessa reação é tido como antígeno. O princípio do método é uma reação imunológica *in vitro* entre antígeno e anticorpo. Com a introdução do hormônio marcado com o isótopo radioativo, este irá



competir com o mesmo anticorpo, em igualdade de condições com o hormônio natural (objeto de dosagem) - (FERREIRA, 1983).

O que ocorre é uma reação de competição entre a substância a ser determinada e a mesma substância marcada (radioisotopicamente) por um receptor específico comum a elas (MOURA *et al.*, 1998). Durante um período de incubação, formam-se os imunocomplexos. Após centrifugação, as parte não ligadas são aspiradas e a parte ligada passa pela leitura em um contador gama. A FIG. 7 ilustra um RIE de duplo anticorpo.

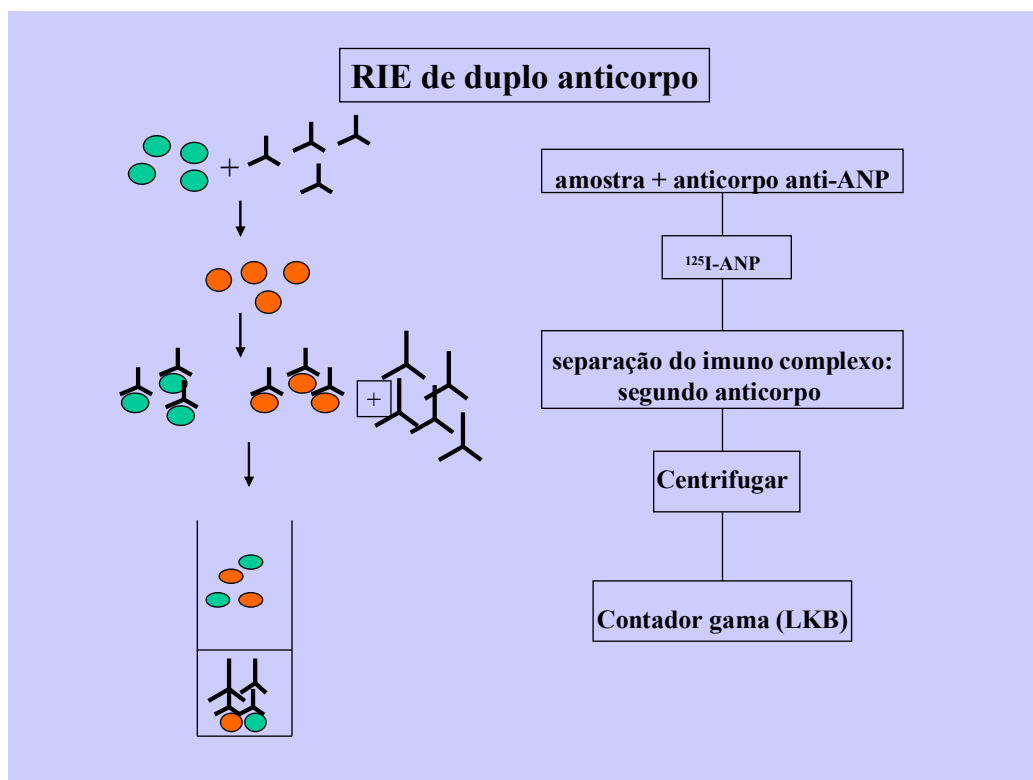


FIGURA 7 - Princípio do método do radioimunoensaio de duplo anticorpo.

O IRMA - *Shionoria* BNP (ou ANP), *Shionogi & Co. Ltd.*, Osaka-Japan, é um *kit* de dosagem para o peptídeo natriurético tipo-B (ou ANP). A técnica é um ensaio

imunorradiométrico, realizado sem a necessidade de extração prévia da amostra. Consiste em uma prática conhecida como "sanduíche" (DEL RY *et al.*, 2000), na qual são utilizados dois anticorpos monoclonais que reconhecem duas regiões distintas do peptídeo. Um deles já vem marcado com o iodo 125, usado como traçador. Apresenta uma fase sólida, em que um dos dois anticorpos é fixado a uma "pérola" previamente preparada para interagir com o peptídeo. Em um tubo de ensaio, é colocado o primeiro anticorpo monoclonal antiBNP (ou antiANP) humano fixado à pérola. No mesmo tubo de ensaio são adicionadas a amostra de plasma e uma solução contendo o segundo anticorpo monoclonal antiBNP (ou antiANP) humano marcado com o iodo 125. Após um período de incubação, uma solução de lavagem é utilizada para remover o que não se ligou e a leitura do conjugado formado (amostra + dois anticorpos) é feita no aparelho Minigama Radiometer. A quantidade de radioatividade emitida (na fase sólida) é proporcional à quantidade de peptídeo, ANP ou BNP, da amostra.

O método de imunoensaio Bayer ADVIA Centaur BNP® - *Bayer Diagnostics Division*, desenvolvido em 2002 (BLUESTEIN *et al.*, 2002), é o primeiro ensaio comercialmente disponível para BNP que utiliza uma plataforma imunoquímica. É uma técnica de imunoensaio por quimioluminescência, que utiliza dois anticorpos (monoclonal-duplo) para duas regiões (sítios) do peptídeo (WU *et al.*, 2004).

Triage BNP Test® - Biosite® *Diagnostics* é um método automatizado para determinação quantitativa do BNP e utiliza imunoensaio de fluorescência. O método é baseado em um cartucho de teste de aproximadamente 2 X 5 X 1cm, onde é introduzida uma amostra de 250µl de sangue total ou plasma, com o auxílio de uma micropipeta. O plasma é transferido por capilares para uma

câmara de reações. Após um período de incubação, o cartucho de teste deve ser introduzido em um aparelho, Triage Meter, onde a leitura é feita por fluorescência (FISCHER *et al.*, 2001; VOGESER; JACOB, 2001).

Abbott AxSYM (*Abbott Laboratories Diagnostic Division*), ensaio imunoenzimático por micropartículas (MEIA), disponível desde 2002 (KELLY *et al.*, 2002), possui dois sítios de ligação e utiliza um anticorpo monoclonal antiBNP, quantificando o peptídeo por meio de fluorescência (CHIEN; CHEN; KAO, 2006).

Roche Elecsys 2010 (*Roche Diagnostics*, Indianapolis, In) para NT-proBNP utiliza o método da eletroquimiluminescência. Ocorre uma interação simultânea entre a amostra e um anticorpo policlonal com biotina e um segundo anticorpo policlonal marcado com rutênio, formando um imunocomplexo. O sistema *Elecsys* consiste de micropartículas magnetizadas revestidas de *streptavidina* onde se ligam os imunocomplexos pela porção biotina de um dos conjugados. Essa ligação ocorre na estação do eletrodo. Assim, basta uma lavagem para a retirada das moléculas não ligadas e pode ser iniciada a reação de quimiluminescência por excitação elétrica e leitura em fotomultiplicador (CHIEN; CHEN; KAO, 2006).

# **3 OBJETIVOS**

### Objetivo Primário

Verificar se a concentração dos peptídeos vasoativos ANP e BNP em sangue fetal é perceptível através da dosagem pelo método de ensaio imunorradiométrico do IRMA, devido à pequena quantidade de peptídeo em circulação no feto e ao pequeno volume de sangue possível de ser obtido.

### Objetivo Secundário

Verificar se o método tem sensibilidade suficiente para perceber variações induzidas por doença fetal (no caso a anemia por isoimunização materna).





# **4 PACIENTES E MÉTODOS**



#### 4.1 Pacientes

Para a realização do estudo de avaliação da técnica do IRMA para dosagem de ANP e BNP em fetos, foram incluídas 17 gestantes. Todas haviam sido encaminhadas ao Centro de Medicina Fetal do Hospital das clínicas - UFMG (no ano de 2002), para submeterem-se à cordocentese para realização de exames tradicionais, como hematimetria (em mães isoimunizadas) e cariótipos de fetos malformados, além de tranfusão intra-uterina.

As gestantes foram consultadas quanto ao interesse de participarem desta pesquisa. Aquelas que consentiram em participar assinaram um termo de concordância, o consentimento informado (APÊNDICE A) e posteriormente foram incluídas no estudo.

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos (COEP-UFMG) e encontra-se registrada no Sistema Nacional de Ética em Pesquisa (SISNEP) sob o nº ETIC 089/05 (ANEXO A).

#### 4.1.1 Caracterização das gestantes estudadas

As gestantes estudadas foram caracterizadas em relação à idade gestacional, paridade e idade, conforme mostram as TAB. 1, 2, 3, 4, 5 e 6 e os GRAF. 1, 2 e 3.

TABELA 1

Distribuição das gestantes por idade gestacional (em semanas)

<b>Idade Gestacional</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual (%)</b>
≤ 24	3	17
25 a 26	4	23
27 a 28	3	18
29 a 30	2	12
31 a 32	3	18
33	2	12
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>

TABELA 2

Caracterização das gestantes de acordo com a idade gestacional (em semanas)

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo - Máximo</b>	<b>Mediana</b>
Idade gestacional	28	23 - 33	28

n= 17

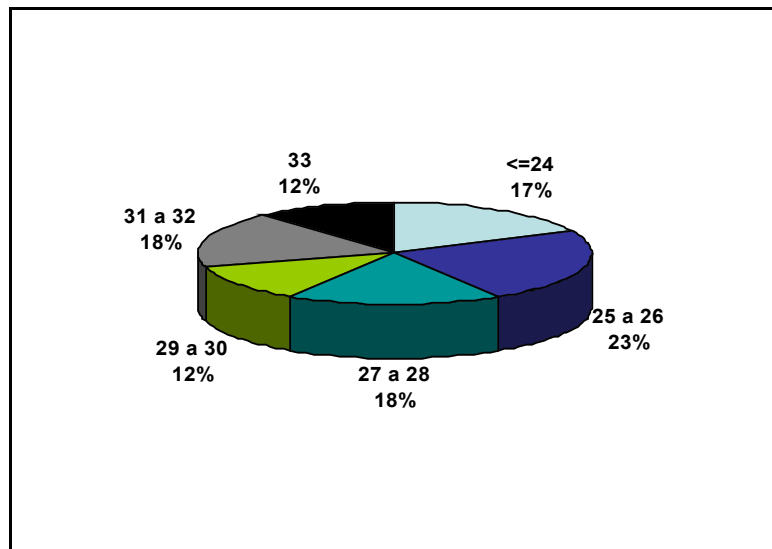


GRÁFICO 1 - Distribuição das gestantes de acordo com a idade gestacional (em semanas).

TABELA 3

Distribuição das gestantes de acordo com a paridade

Paridade	Frequência	Percentual (%)
2	7	41
3	1	6
4	8	47
6	1	6
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>

TABELA 4

Caracterização das gestantes de acordo com a paridade

Características	Média	Mínimo - Máximo	Mediana
Paridade	3,24	2 - 6	4

n= 17

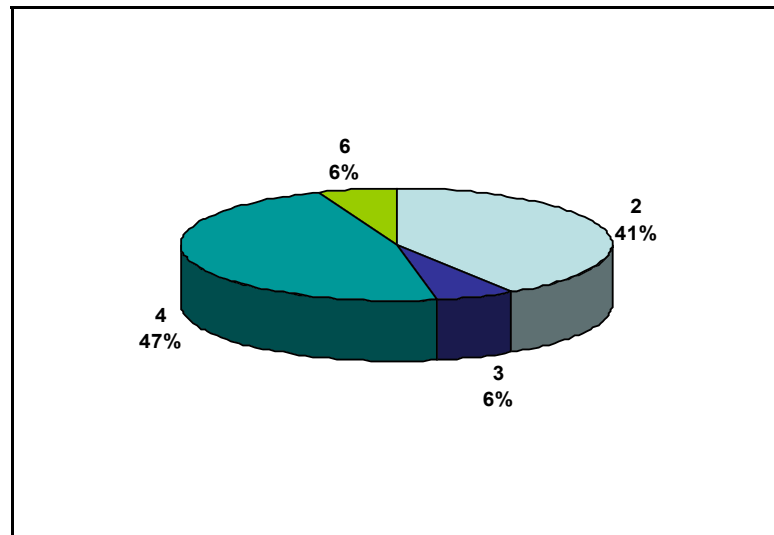


GRÁFICO 2 - Distribuição das gestantes de acordo com a paridade.

TABELA 5

Distribuição das gestantes de acordo com a idade (em anos)

<b>Idade</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual (%)</b>
≤ 21	5	28
22 a 24	4	24
25 a 27	1	6
28 a 30	2	12
31 a 33	4	24
≥ 34	1	6
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>100</b>

TABELA 6

Caracterização das gestantes de acordo com a idade (em anos)

<b>Características</b>	<b>Média</b>	<b>Mínimo - Máximo</b>	<b>Mediana</b>
Idade	25,29	19 - 34	23

n= 17

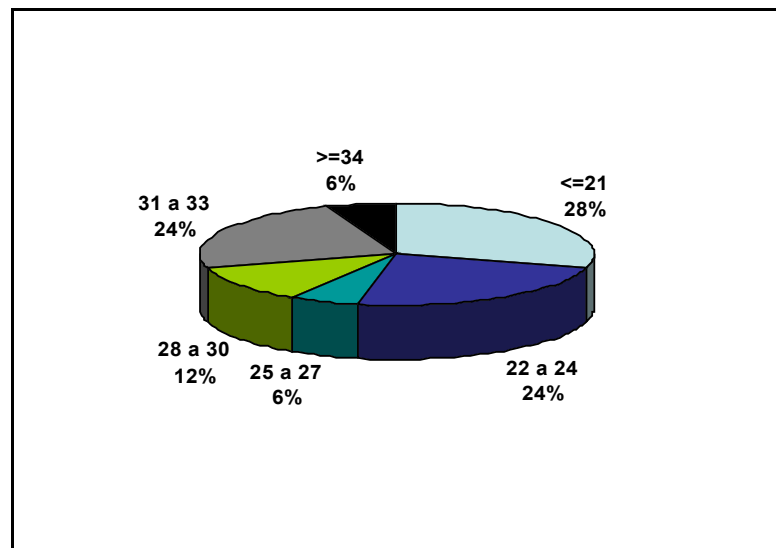


GRÁFICO 3 - Distribuição das gestantes por idade (em anos).

TABELA 7

Descrição dos fetos de acordo com o valor da hemoglobina pré-TIU

Variável	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Mediana	Máximo
Hb-pré TIU	17	9,735	3,564	3,600	10,000	15,500

Hb Pré-TIU: hemoglobina pré-transfusão intra-uterina; N: número de casos.

Os fetos que apresentaram hemoglobina < 10g/dl foram considerados anêmicos.

#### 4.1.2 Critérios de inclusão

- Gestante, do Centro de Medicina Fetal do HC - UFMG, com indicação para realizar cordocentese (hematimetria ou cariótipo) e posteriormente transfusão intra-uterina.
- Concordância em participar do estudo - consentimento informado.
- Confirmação da punção da veia umbilical certificando a pureza do sangue fetal (volume corpuscular médio - VCM >106 fL).

#### 4.1.3 Critérios de exclusão

- Cardiopatia fetal.
- Malformações congênitas
- Uso de fármacos com ação no coração fetal (exemplo: dicalicot, propanolol).
- Pré-eclampsia e/ou hipertensão arterial crônica (HAC).
- Diabetes materno.

## 4.2 Métodos

### 4.2.1 Cordocentese - técnica de coleta do sangue fetal

A coleta do sangue fetal para posterior dosagem pela técnica do IRMA foi realizada pela equipe do Centro de Medicina Fetal da UFMG, através de cordocentese, seguindo-se o protocolo do serviço.

O sangue fetal foi obtido da veia do cordão umbilical das gestantes cujos fetos eram submetidos à transfusão intra-uterina. Sempre que se realiza uma transfusão desse tipo, é necessária a retirada de certa quantidade de sangue do feto para exame hematimétrico antes que ele receba o novo sangue. Era desse volume retirado de sangue fetal que se obtinha a amostra para a dosagem dos peptídeos vasoativos.

Guiados pelo aparelho de ultra-som Siemens SONOLINE Prima, dois profissionais do CEMEFE-HC/UFMG (sempre os mesmos) iniciavam o procedimento com anti-sepsia abdominal materna em local previamente selecionado para punção. Em seguida, era aplicado um anestésico local (xylocaína 1% sem adrenalina) para anestesia no abdome materno. Para obtenção do sangue, uma agulha longa (BD 20 Gauge) era introduzida através do abdome materno e puncionava a veia umbilical, em local próximo à inserção placentária ou em alça livre no cordão umbilical.



FIGURA 8 – Foto tirada pelo aparelho de ultra-som durante a cordocentese

A quantidade aspirada variou entre 5 e 7ml de sangue fetal. Desse volume:

- 1ml foi utilizado para determinação do grupo sanguíneo, fator Rh e valor de hemoglobina fetais. Uma pequena parte foi usada para determinação rápida quantitativa da hemoglobina no sangue fetal, no aparelho *HEMOCUE® (B-Hemoglobin Photometer HEMOCUE AB; ANGELHOLM SWEDEN)* previamente calibrado, o que permite imediato conhecimento do valor de hemoglobina e, desta forma, possibilita prever o grau de anemia fetal a fim de fazer a programação do volume a ser transfundido (nos casos indicados). O restante foi encaminhado ao Laboratório Central do HC/UFMG para confirmação da hemoglobina dosada no *HEMOCUE®* e avaliação do VCM para certificação de que o sangue foi colhido da veia umbilical e não da circulação materna.
- 1ml recolhido em seringa pré-heparinizada foi usado para a gasometria.
- 1 a 2ml, obtido e repassado para tubos tipo Vacutainer® contendo EDTA, foi utilizado para dosagem dos peptídeos natriuréticos (ANP e BNP). Esse



volume de sangue fetal foi encaminhado ao Laboratório de Medicina Fetal do CEMEFE-HC/UFMG para ser centrifugado e armazenado.

#### 4.2.2 Técnica de processamento e armazenamento do sangue fetal

Inicialmente, cada uma das amostras de mais ou menos 1,0ml de sangue fetal foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm, a 4°C, em um aparelho Eppendorf Centrífuga 5403, para que fosse retirado o plasma sanguíneo com micropipeta. O plasma separado foi acondicionado em tubo de eppendorf de 2ml, os tubos foram identificados, conforme registro do caso, no banco de dados do estudo e armazenado em nitrogênio líquido a -196°C. As amostras congeladas foram posteriormente usadas para a dosagem dos peptídeos natriuréticos vasoativos pela técnica do IRMA.

#### 4.2.3 Técnica de dosagem dos peptídeos ANP e BNP pelo método IRMA (ensaio imunorradiométrico)

Para dosar os peptídeos vasoativos fetais - ANP e BNP - pela técnica do IRMA, foi utilizado um *kit* de ANP e outro de BNP marca *SHIONOGI & Co.Ltd.Osaka-Japan*.

A técnica IRMA é conhecida como “sanduíche”. Utiliza dois anticorpos monoclonais que reconhecem a região carboxiterminal e a estrutura intramolecular em forma de anel do peptídeo, respectivamente.

O SHIONOGI ANP e o SHIONOGI BNP são *kits* de ensaio imunorradiométrico para a determinação quantitativa desses peptídeos natriuréticos e apresentam como princípio imunorradiométrico uma fase sólida em que um dos dois anticorpos monoclonais é fixado a uma "pérola" que deve ser previamente preparada para interagir com o sítio específico do peptídeo. O segundo anticorpo é marcado com o radioisótopo iodo 125 ( $I^{125}$ ), usado como traçador, como mostra a FIG. 9.

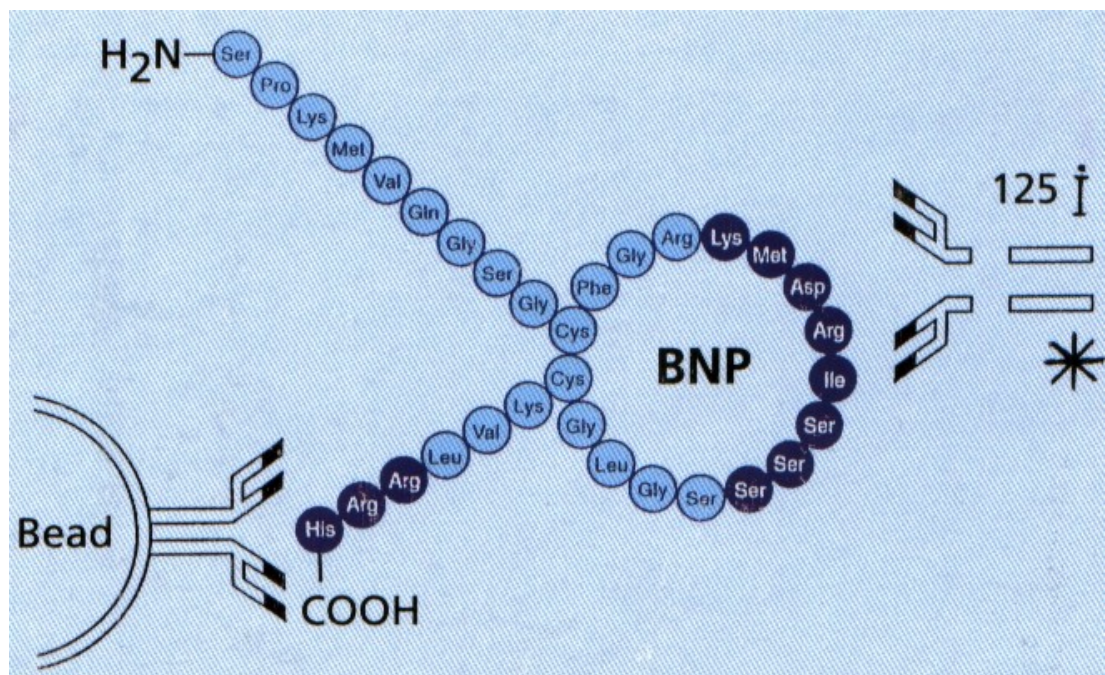


FIGURA 9 - Desenho da técnica IRMA.

Para a dosagem dos peptídeos, o primeiro anticorpo monoclonal antiANP ou antiBNP humano foi colocado em um tubo de ensaio de polietileno fixado à

"pérola" (fase sólida). A ele foram adicionados 100µl da amostra de plasma fetal e 200µl de solução contendo o segundo anticorpo monoclonal antiANP ou antiBNP humano marcado com o I<sup>125</sup>.

A curva foi preparada a partir da reconstituição dos padrões com 0,5ml de água destilada em cada um dos seis tubos contendo concentrações crescentes, fixas e definidas de ANP ou BNP sintético humano liofilizado (tubos de A a H nas seguintes concentrações: 4, 10, 40, 150, 600, 2000pg/ml). Dois controles com concentração de 20 e 300pg/ml fornecidos pelo *kit* foram usados no ensaio após reconstituição com 0,5ml de água destilada. Esse conjugado (amostra + dois anticorpos) foi levemente misturado (em agitador vortex) e os tubos foram incubados overnight (22 horas / 2-8°C).

O conteúdo líquido dos tubos foi aspirado cuidadosamente o máximo possível. Adicionaram-se 2ml de solução de lavagem (previamente reconstituída com 1.000ml de água destilada) em cada tubo, o que foi posteriormente aspirado. Esse processo de lavagem e aspiração foi repetido uma vez.

A leitura da reação foi feita no aparelho *Minigama Radiometer*. A quantidade de radioatividade emitida (na fase sólida) é proporcional à quantidade de peptídeo, ANP ou BNP, da amostra.

A dosagem dos peptídeos vasoativos fetais pela técnica do IRMA foi feita no Laboratório de Endocrinologia e Metabolismo do Departamento de Fisiologia do ICB da UFMG, coordenado pela Professora Adelina Martha dos Reis. As

amostras foram transportadas até o laboratório em recipiente de isopor com gelo seco, sendo descongeladas apenas na hora da realização das dosagens.

### 4.3 Metodologia Estatística

#### 4.3.1 Tipo de estudo

Trata-se de estudo descritivo, transversal. O resultado considerado tem avaliação qualitativa (percepção dos peptídeos pelo método testado).

#### 4.3.2 Análise estatística

Foram utilizadas tabelas para a descrição das dosagens sanguíneas fetais do ANP e do BNP (pg/ml) e gráficos de distribuição para as distribuições dos níveis sanguíneos fetais do ANP e do BNP (pg/ml). E um outro gráfico para descrição dos fetos quanto à presença ou ausência de anemia fetal (Hb ,10g/dl).

A correlação entre níveis de hemoglobina pré-TIU e as concentrações de ANP e BNP no sangue fetal, foram verificadas através da análise por regressão.

Para realizar o estudo foi utilizado o programa MINITAB Inc® versão 11.12 de 1996.

O nível de significância considerado foi de  $p < 0,05$ .



# **5 RESULTADOS**

## 5.1 Grupo de estudo

Neste estudo foram analisados os resultados das dosagens de ANP e BNP dos fetos de 17 gestantes, seguindo-se os critérios de inclusão descritos no capítulo 4 deste estudo.

Em uma das 17 amostras de sangue fetal foi obtida apenas a dosagem de ANP e em uma outra apenas a dosagem de BNP. Já que eram duas amostras com menor quantidade. Sendo assim, dos 17 fetos incluídos no estudo, obtivemos 16 dosagens de ANP e 16 dosagens de BNP.

## 5.2 Descrição das dosagens sanguíneas fetais de ANP

Pela TAB. 8 é possível verificar que em 16 dosagens de ANP fetal realizadas, o valor mínimo encontrado foi de 26pg/ml e o máximo de 655,2pg/ml. Isso mostrando que o teste foi sensível à variação dos valores. A mediana foi 89,7pg/ml e a média 144,8pg/ml. O GRAF. 4 representa a distribuição dos valores sanguíneos fetais do ANP.

TABELA 8

Descrição das dosagens sanguíneas fetais de ANP (pg/ml)

Variável	N	Média	Média SE	Desvio-Padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
ANP (pg/ml)	16	144,8	39,0	155,9	26,0	55,4	89,7	212,0	655,2

ANP: peptídeo atrial natriurético; N: número de casos

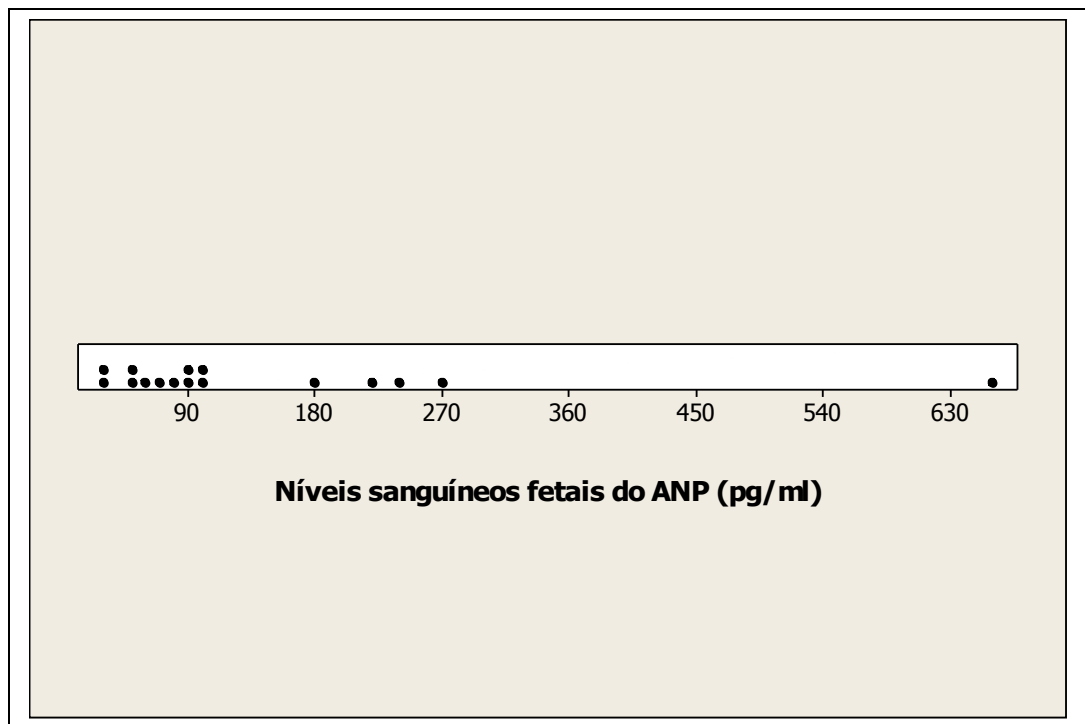


GRÁFICO 4 - Distribuição dos níveis sanguíneos fetais do ANP (pg/ml).



### 5.3 Descrição das dosagens sanguíneas fetais de BNP

A TAB. 9 mostra que os valores de BNP fetais das 16 amostras analisadas variaram de 11,9pg/ml a 284,9pg/ml. O GRAF. 5 representa a distribuição dos valores sanguíneos fetais do BNP.

TABELA 9

Descrição das dosagens sanguíneas fetais de BNP (pg/ml)

Variável	N	Média	Média SE	Desvio-padrão	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
BNP (pg/ml)	16	67,7	17,4	69,6	11,9	19,0	46,2	92,0	284,9

BNP - peptídeo natriurético tipo-B; N - número de casos

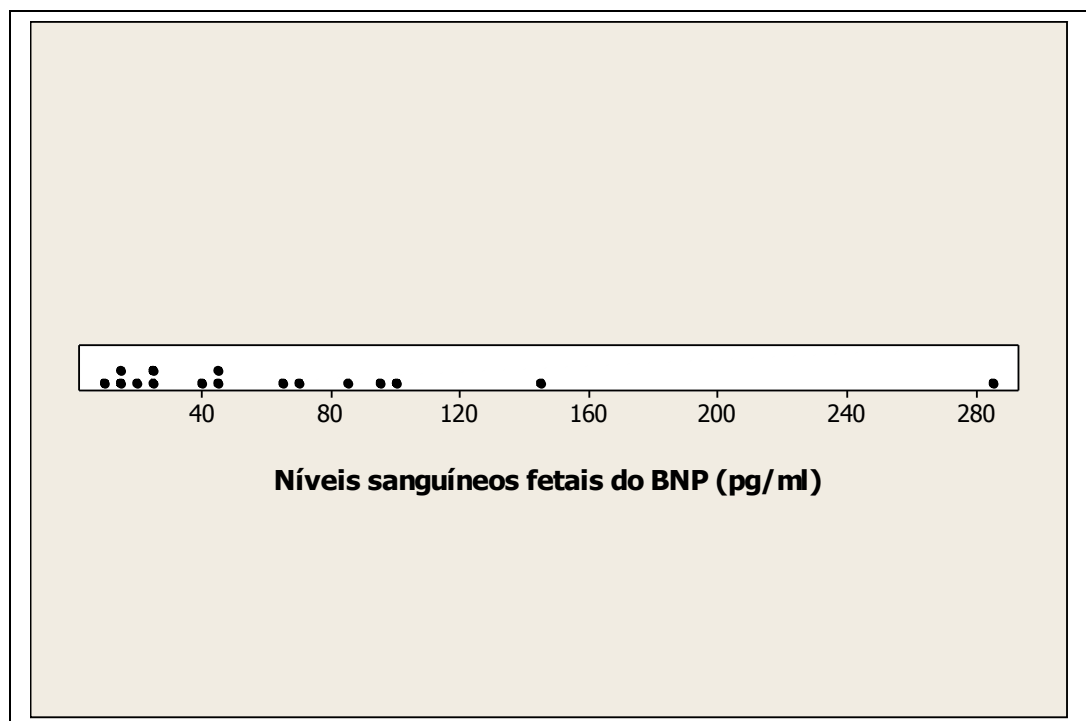


GRÁFICO 5 - Distribuição dos níveis sanguíneos fetais do BNP (pg/ml).

#### 5.4 Descrição dos fetos segundo presença ou ausência de anemia fetal - (Hb <10g/dl)

No grupo dos fetos não anêmicos (Hb  $\geq$ 10g/dl), o valor médio da hemoglobina encontrado foi de 12,56g/dl. Já no grupo dos fetos com anemia (Hb <10 g/dl), a média da hemoglobina foi de 6,56g/dl. Essa comparação pode ser visualizada no GRAF. 6.

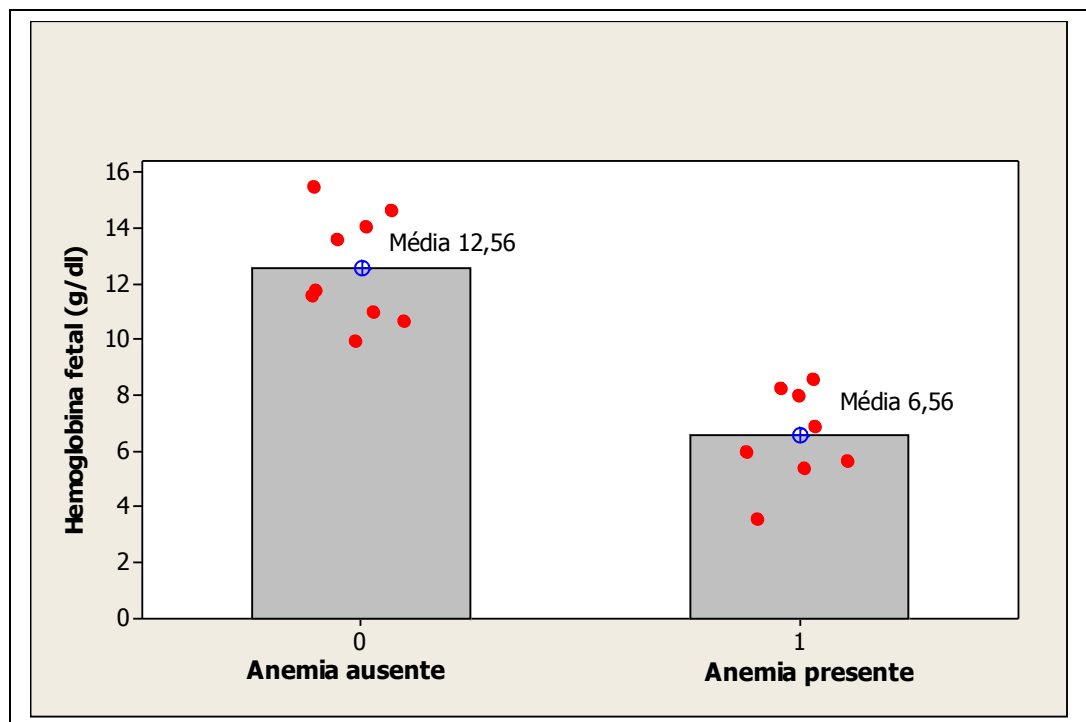


GRÁFICO 6 - Descrição dos fetos quanto à presença ou ausência de anemia fetal (Hb <10 g/dl).

### 5.5 Correlação entre níveis de Hb e ANP no sangue fetal

Na análise por regressão a associação entre os valores sanguíneos fetais de ANP (pg/ml) e valores fetais de Hb-pré-TIU (g/dl), não mostrou correlação entre eles ( $p=0,491$ ), como mostra o GRÁF. 7.

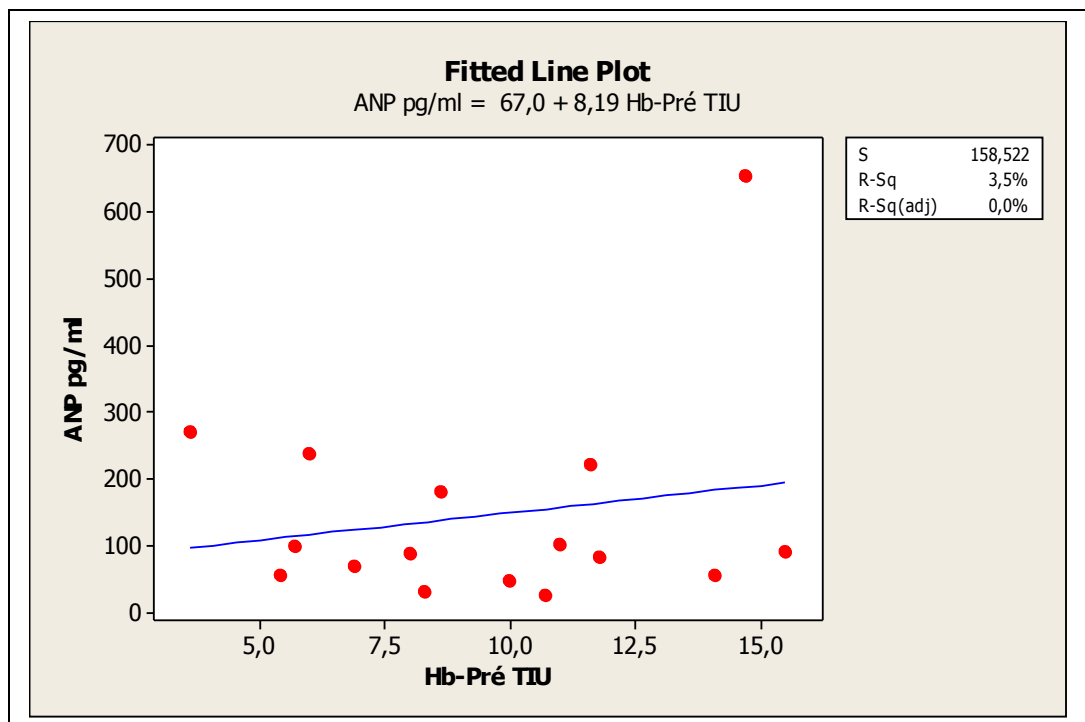


GRÁFICO 7 - Correlação entre níveis de Hb pré-TIU e ANP no sangue fetal

( $p=0,491$ ).

### 5.6 Correlação entre níveis de Hb e BNP no sangue fetal

A partir da análise por regressão que associou os níveis de BNP (pg/ml) com os valores da Hb-pré-TIU no sangue dos fetos, registrou-se correlação positiva ( $p=0,010$ ), verificando-se que o BNP diminui à medida que aumenta o valor da hemoglobina.

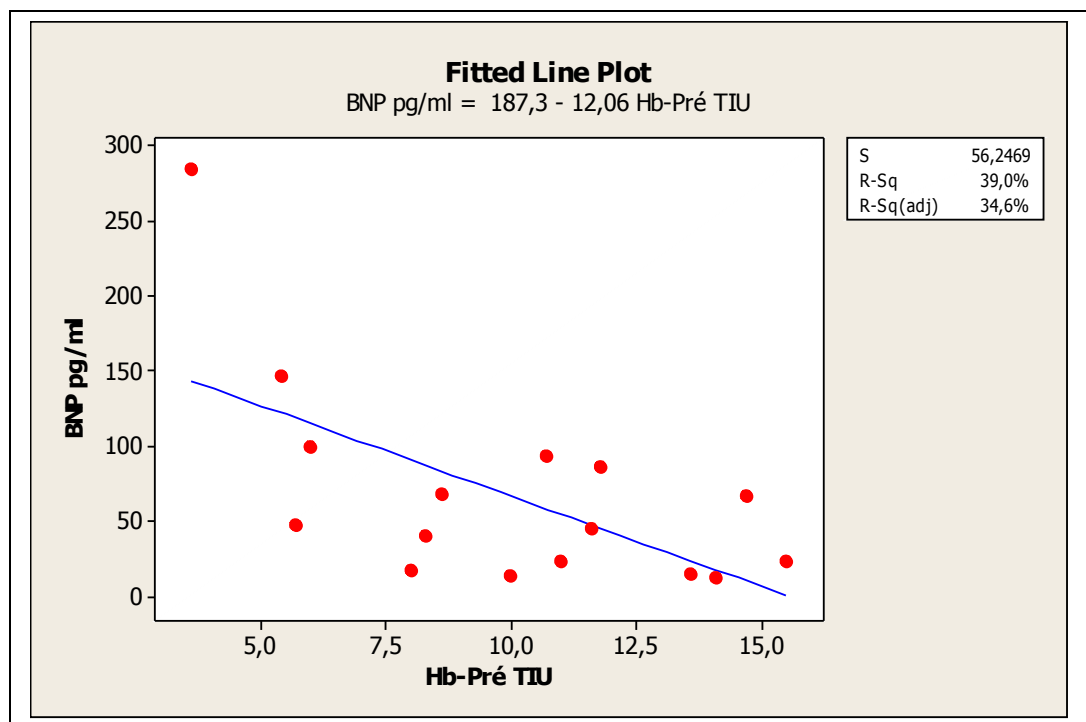


GRÁFICO 8 - Correlação entre níveis de Hb pré-TIU e BNP no sangue fetal  
( $p=0,010$ ).

# **6 COMENTÁRIOS**

O presente estudo se propôs a verificar a possibilidade de dosagem dos peptídeos ANP e BNP no sangue fetal. O motivo dessa dúvida se refere ao fato de saber-se que o feto sintetiza diversos hormônios e peptídeos vasoativos em pequena quantidade, compatível com seu nível de complexidade tecidual, ainda em crescimento e elaboração.

A importância de se dispor de uma técnica capaz de dosar substâncias fetais (sensibilidade do método) a partir de pequeno volume de amostras sanguíneas é imensurável. A partir desses métodos, pode-se estudar a fisiologia do feto humano e a evolução natural de algumas doenças que sabidamente alteram as concentrações dessas substâncias a serem dosadas.

Tradicionalmente, a dosagem dos peptídeos vasoativos ANP e BNP se realizava por radioimunoensaio (RIE) que, para sua completa realização (calibração das colunas e dosagem), necessita de amostra superior a 5ml, idealmente superior a 10ml de sangue total. Esse volume em fetos no segundo trimestre corresponde à quantidade próxima de 4% da sua volemia total, tendo o potencial de promover repercussões hemodinâmicas fetais (CABRAL, 2005).

O teste de dosagem dos peptídeos vasoativos pela técnica do IRMA testado em 1996 (CLERICO *et al.*, 1996) caracteriza-se por utilizar amostras de pequeno volume, mantendo a mesma confiabilidade dos resultados do RIE (CLERICO; LEVARSÍ; MARIANI, 1999), tornando o método potencialmente de grande utilização no feto humano, principalmente com idade gestacional distante do termo. Por esta razão, escolhemos o *Kit* IRMA para dosar o ANP e o BNP em

nosso estudo. Pela primeira vez esse método foi utilizado para dosagem dos peptídeos vasoativos em sangue fetal.

Os resultados do presente estudo foram conclusivos em mostrar dosagem do ANP e do BNP em fetos na faixa gestacional entre 23 e 33 semanas. Em média, as dosagens foram realizadas em amostras de sangue fetal com volume médio de 1,5ml.

Outro aspecto que também se tentou mostrar neste trabalho é que fatores sabidamente determinantes de elevação dos peptídeos vasoativos, a partir de sua ocorrência, mostram variações de resultados quanto à especificidade do método IRMA. Assim sendo, mostrou-se de forma definitiva que fetos anêmicos, sabidamente uma condição que altera a concentração dos peptídeos vasoativos, apresentam concentrações diferentes conforme o grau diferenciado de sua anemia.

A isoimunização (Rh) é caracterizada por uma circulação hiperdinâmica com velocidade de fluxo sanguíneo aumentada nas artérias e veias. Além disso a anemia fetal é compensada por uma aumentada carga cardíaca. Ville *et al.* (1994) encontraram níveis aumentados de ANP em fetos anêmicos, acidêmicos e hidróticos. Já Kingdom *et al.* (1989) referenciaram níveis aumentados de ANP após transfusão intravascular, diferente do relato feito por Walter; Stepan; Faber (2001), que encontraram níveis aumentados de BNP após transfusão intravascular mas verificaram que o ANP não se alterou. Fisk *et al.* (1990) relataram níveis aumentados de ANP em fetos não hidróticos e níveis diminuídos de ANP em fetos hidróticos após transfusão. Pode-se perceber facilmente como

são conflitantes os resultados encontrados com relação as concentrações do ANP na circulação fetal e em doenças fetais.

Walter; Stepan; Faber (2001), em trabalho realizado com 9 fetos isoimunizados e 9 fetos sem isoimunização (controles), verificaram que o ANP mostrou-se aumentado na presença da isoimunização (Rh) e o BNP não apresentou aumento significativo. Em nosso estudo encontramos resultado divergente. Utilizando uma amostragem maior, 17 fetos com isoimunização, verificamos ao efetuar a análise de regressão, que a diminuição no valor da hemoglobina pré-TIU (maior grau de anemia) está associada a um aumento no nível do BNP (GRÁFICO 8), mostrando correlação entre o peptídeo e a anemia fetal.

A partir dos resultados aqui encontrados a técnica do IRMA passa a ser plenamente validada para estudar condições clínicas e doenças fetais que, sem dúvida, interferem na produção e secreção desses peptídeos.

No CEMEFE do HC-MG os estudos a respeito do diagnóstico da insuficiência cardíaca fetal, do ponto de vista bioquímico, passarão a utilizar o BNP como marcador da contratilidade do músculo cardíaco do coração fetal.

Outras situações capazes de alterar os peptídeos vasoativos, como o ANP na transfusão feto-fetal (no feto pletórico), poderão, a partir de agora, ter as dosagens realizadas por esse método descrito e validado neste estudo.



Desta forma, esperamos ter contribuído com pequeno avanço no conhecimento do feto humano, com resultados futuros de melhor condução em situações de risco à saúde fetal.

# **7 CONCLUSÃO**

Em face dos resultados obtidos, pode-se concluir que a técnica de dosagem dos peptídeos vasoativos pelo método do IRMA é viável e confiável quando realizada em sangue fetal.

# REFERÊNCIAS

ANTUNES-RODRIGUES, J. *et al.* Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 15, p. 6828-6831, Aug., 1992.

APPEL, R.G. Growth-regulatory properties of atrial natriuretic factor. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 262, n. 6, pt. 2, p. f911-f918, June., 1992.

BAJORIA, R.; WARD, S.; SOORANNA, S.R. Atrial natriuretic peptide mediated polyuria: pathogenesis of polyhydramnios in the recipient twin of twin-twin transfusion syndrome. **Placenta**, London, v. 22, n. 8-9, p. 716-724, Sep-Oct., 2001.

BAJORIA, R.; WARD, S.; CHATTERJEE R. Natriuretic peptides in the pathogenesis of cardiac dysfunction in the recipient fetus of twin-twin transfusion syndrome. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 186, n. 1, p. 121-127, Jan., 2002.

BLUESTEIN, B.I. *et al.* Development of an automated test for B-type natriuretic peptide (BNP) as an aid in the diagnosis and evaluation of congestive heart failure on the Bayer ADVIA Centaur chemiluminescent system. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 48, n. 6, Supplement, p. 85, 2002.

BRACE, R.A.; CHEUNG, C.Y. Cardiovascular and fluid responses to atrial natriuretic factor in sheep fetus. **The American Journal of Physiology**, Washington, v. 253, n 4 pt 2, p. 561-567, Oct., 1987.

BRENNER, B.M. *et al.* Diverse Biological of Atrial Natriuretic Peptide. **Physiological Reviews**, Bethesda MD, v. 70, n. 3, p. 665-699, July, 1990.

BOLLI, P. The vasodilator potency of atrial natriuretic peptide in man. **Circulation**, Dallas, v. 75, n. 1, p. 221-228, Jan., 1987.

CABRAL, A.C.V. **Medicina Fetal. O feto como paciente**. Cooperativa Editora e de Cultura Médica, Belo Horizonte, p. 306, 2005.

CAMERON, V.A. *et al.* The sites of gene expression of atrial, brain and C-Type natriuretic peptides in mouse fetal development: temporal changes in embryos and placenta. **Endocrinology**, Baltimore MD, v. 137, p. 817-824, Mar., 1996.

CAMERON, V.A.; RICHARDS, A.M. Natriuretic peptide system in fetal heart and circulation. **Journal of Hypertension**, London, v.20, n. 5, p. 801-803, May, 2002.

CAMERON, V.A.; ELLMERS, L.J. Minireview: natriuretic peptide during development of the fetal heart and circulation. **Endocrinology**, Springfield, v. 144, n. 6, p. 2191-2194, June, 2003.

CHEUNG, C. Y.; BRACE, R. A. Fetal hypoxia elevates plasma atrial natriuretic factor concentration. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 159, n. 5, p. 1263-1268, Nov., 1988.

CHEUNG, C.Y.; ROBERTS, V.J. Developmental changes in atrial natriuretic factor content and localization of its messenger ribonucleic acid in ovine fetal heart. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 169, n. 5, p. 1345-1351, Nov., 1993.

CHEUNG, C.Y. Regulation of atrial natriuretic factor secretion and expression in the ovine fetus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, New York, v. 19, n. 2, p. 159-164, Summer, 1995.

CHIEN, T.; CHEN, H.; KAO, J. Comparison of Abbott AxSYM and Roche Elecsys 2010 for Measurement of BNP and NT-proBNP. **Clinica Chimica Acta**, S.I., v. 369, n. 1, p. 95-99, July, 2006.

CLERICO, A. *et al.* Evaluation and Comparison of the Analytical Performances of two RIA Kits for the Assay of Atrial Natriuretic Peptides (ANP). **The Journal of Nuclear Medicine and Allied Sciences**, Torino, v. 34, n.2, p. 81-87, Apr-June, 1990.

CLERICO, A. *et al.* Analytical performance and clinical usefulness of a commercially available IRMA kit for measuring atrial natriuretic peptide in patients with heart failure. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 42, n. 10, p. 1627-1633, May, 1996.

CLERICO, A.; LEVARSI, G.; MARIANI, G. Pathophysiologic relevance of measuring the plasma levels of cardiac natriuretic peptide hormones in humans. **Hormone and Metabolic Research**, New York, v. 31, n. 9, p. 487-498, Sep., 1999.

CLÉRICO, A.; DEL RY, S.; GIANNESI, D. Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generations of immunoassay methods. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 46, n. 10, p. 1529-1534, 2000.

CLERICO, A.; EDMIN, M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 50, n. 1, p. 33-50, Jan., 2004.

CLERICO, A. *et al.* Analytical performance and diagnostic accuracy of immunometric assays for the measurement of plasma B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 51, n. 2, p. 445-447, Feb., 2005.

CORRÊA JÚNIOR, M.D. **Avaliação das concentrações séricas dos peptídeos natriuréticos vasoativos ANP e BNP nos fetos de mães hipertensas e normotensas.** 2002.73p. Dissertação (Mestrado em Ginecologia e Obstetrícia) – Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

DE BOLD, A.J. *et al.* A rapid and potent response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, Oxford, v. 28, n. 1, p. 89-94, Jan. 1981.

DEL RY, S. *et al.* Measurement of brain natriuretic peptide in plasma samples and cardiac tissue extracts by means of an immunoradiometric assay method. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigations**, Torino, v. 60, n. 2, p. 81-90, Apr., 2000.

DOS REIS, A.M. *et al.* Characterization and distribution of natriuretic peptide receptors in the rat uterus. **Endocrinology**, Baltimore, v. 10, n. 136, p. 4247-4253, 1995.

ESPINER, E.A.; RICHARDS, A.M. Atrial natriuretic peptide – an important factor in sodium and blood pressure regulation. **Lancet**, New York, v. 1, n. 8640, p. 707-710, Apr, 1989.

ESPINER, E.A. Minisymposium: the natriuretic peptides hormones. physiology of natriuretic peptides. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 235, n. 6, p. 527-541, June, 1994.

ESPINER, E.A. *et al.* Natriuretic hormones. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 24, n. 23, p. 481-509, Sep., 1995.

FERREIRA, V.L.M. **O radioimunoensaio**. Princípios e fundamentos da radioatividade e radioproteção. Aplicação à biologia e medicina. Cooperativa Editora Cultura Médica Ltda, Belo Horizonte, p. 87, 1983.

FISCHER, Y. *et al.* Evaluation of a new, rapid bedside test for quantitative determination of B-type natriuretic peptide. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 47, n. 3, p. 591-594, Mar., 2001.

FISK, N.M. *et al.* Atrial natriuretic peptide in fetal disease. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 97, v. 6, p. 545-546, June, 1990.

FRANÇA, J.L. *et al.* **Manual para normalização de publicações técnico-científicas**. Belo Horizonte, Ed. UFMG. 241p.

GARDNER, D.G. *et al.* Expression of the Atrial Natriuretic Peptide Gene in Human Fetal Heart. **Journal of Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 69, n. 4, p. 729-737, Oct., 1989.

GRAHAM, C.H. *et al.* Expression of atrial natriuretic peptide by third-trimester placental cytotrophoblasts in women. **Biology of Reproduction**, New York, v. 54, n. 4, p. 834-840, Apr., 1996.

GUTKOWSKA, J. *et al.* Circulating forms and radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 183-193, Mar, 1987.

GUTKOSKA, J. *et al.* The atrial natriuretic peptide system in rat ovaries. **Endocrinology**, Baltimore, v. 12, n. 132, p. 639-700, 1993.

HAMMERER-LERCHER, A. *et al.* Head-to-head comparison of N-terminal pro-brain natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and N-terminal pro-atrial natriuretic peptide in diagnosing left ventricular dysfunction. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 310, n. 2, p. 193-197, Aug., 2001.

HOLCBERG, G. *et al.* The action of two natriuretic peptide (atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide) in the human placental vasculature. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 172, n. 1, p. 71-77, Jan., 1995.

HOLMES, S.J. *et al.* Renal, endocrine and hemodynamic effects of human brain natriuretic peptide in normal man. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Bethesda, v. 76, n. 1, p. 91-96, Jan., 1993.

HOSODA, K. *et al.* Expression of Brain Natriuretic Peptide Gene in Human Heart. Production in the Ventricle. **Hypertension**, Dallas, v. 17, n. 6, p. 1152-1155, June, 1991.

HYETT, J.A. *et al.* Cardiac gene expression of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in trisomic fetuses. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 87, n. 4, p. 506-510, Apr., 1996.

ITOH, H. *et al.* Plasma brain natriuretic peptide level in pregnant women with pregnant-induced hypertension. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 82, n. 1, p. 71-77, July, 1993.

JAMIESON, J. D.; PALADE, G.E. Specific granules in atrial muscles cells. **The Journal of Cell Biology**, New York, v. 23, n. 1, p. 151-172, Oct., 1964.

JANSSEN, W.M. *et al.* Antihypertensive effect of a 5-day infusion of atrial natriuretic factor in humans. **Hypertension**, Dallas, v. 13, n. 6 pt 1, p. 640-646, June, 1989.

JOHNSON, D.D. *et al.* Effect of three hours of hypoxia on atrial natriuretic factor gene expression in the ovine fetal heart. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 176, n. 1, p. 42-48, Jan., 1997.

KANGWA, K.; MATSUO, H. Purification and complete amino acid sequence of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide ( $\alpha$ -hANP). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 118, n. 1, p. 131-139, Jan., 1984.

KELLY, P.M. *et al.* A novel assay for the measurement of plasma B-type natriuretic peptide by an AxSYM® microparticle based immunoassay with use of stable liquid calibrators. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 48, n. 6, Supplement, p. 94, 2002.



KENNY, A.J. *et al.* Hydrolysis of human and pig brain natriuretic peptides, urodilatin, C-type natriuretic peptide and some C-receptor ligandas by endopeptidase-24.11. **The Biochemical Journal**, London, v. 291, n. 1, p. 83-88, Apr., 1993.

KIM, S.H. *et al.* Characterization of the Atrial Natriuretic Peptide System in the Oviduct. **Endocrinology**, Baltimore, v. 138, n. 6, p. 2410-2416, 1997.

KINGDOM, J.P.C. *et al.* Atrial natriuretic peptide in the fetus. **BMJ (Clinical research ed)**, London, v. 298, n. 6682, p. 1221-1222, May, 1989.

KINGDOM, J.C.P. *et al.* Maternal and fetal atrial natriuretic peptide levels at delivery from normal and growth retarded pregnancies. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 99, n. 10, p. 845-849, Oct., 1992.

KINNUNEN, P.; VUOLTEENAHO, O.; RUSKOAHO, H. Mechanisms of atrial and brain natriuretic peptide release from rat ventricular myocardium: effect of stretching. **Endocrinology**, Springfield, v. 132, n. 5, p. 1961-1970, May, 1993.

KISCH, B. Electron microscopy of the atrium of the heart. I. guinea pig. **Experimental Medicine and Surgery**, New York, v. 14, n. 2-3, p. 99-112, 1956.

KOLLER, K.J.; GOEDEL, V.D. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. **Circulation**, Dallas, v. 86, n. 4, p. 1081-1088, Oct., 1992.

LAURIA, M.R. *et al.* Brain natriuretic peptide and cyclic guanosine-3',5' monophosphate in pre-eclampsia. **The Journal of Maternal-Fetal Medicine**, New York, v. 5, n. 3, p. 128-131, May-June, 1996.

LEVIN, E.R.; GARDNER, D.G.; SAMSON, W. K. Natriuretic peptides. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 339, n. 5, p. 321-328, July, 1998.

LEWIS, H.M. *et al.* Development and Vasodilation of a Two-Site Immunoradiometric Assay for Human Atrial Natriuretic Factor in Unextracted Plasma. **Clinical Chemistry**, Washington DC v. 35, n. 6, p. 953-957, Mar., 1989.

MAACK, T. *et al.* Physiological role of silent receptors of atrial natriuretic factor. **Science**, Washington, v. 238, n. 4827, p. 675-678, Oct., 1987.

McGRATH, M.F.; DE BOLD, A. J. Determinants of natriuretic peptide gene expression. **Peptides**, New York, v. 26, n. 6, p. 933-943, June, 2005.

MAKIKALLIO, K. *et al.* Umbilical artery n-terminal peptide of proatrial natriuretic peptide in hypertensive pregnancies and fetal acidemia during labor. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 97, n. 1, p. 23-28, Jan., 2001.

MENEZES, G.A. **Concentração placentária dos peptídeos natriuréticos ANP e BNP. Correlação da concentração placentária e parâmetros clínicos maternos e fetais em gestações de normotensas e de hipertensas.** 2002. 115p. Tese (Doutorado em Ginecologia e Obstetrícia) – Belo Horizonte, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

MIR, T.S. *et al.* Plasma concentration of aminoterminal pro atrial natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked and rapid increase after birth. **Pediatrics**, Illinois, v. 112, n. 4, p. 896-899, Oct., 2003.

MOURA, R.A. *et al.* **Técnicas de Laboratório**. Editora Atheneu. São Paulo, 3ª Edição, 511p, 1998.

MUKOYAMA, M. *et al.* Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. **The Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 87, n. 4, p. 1402-1412, Apr., 1991.

NAKAO, K. *et al.* Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. I: Natriuretic peptides. **Journal of Hypertension**, London, v. 10, n.9, p. 907-912, Sep., 1992a.

NAKAO, K. *et al.* Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: natriuretic peptides receptors. **Journal of Hypertension**, London, v. 10, n.10, p. 1111-1114, Oct., 1992b.

NAKAYAMA, T. The genetic contribution of the natriuretic peptide system to cardiovascular diseases. **Endocrine Journal**, Tokyo, v. 52, n. 1, p. 11-21, Feb., 2005.

NUMATA, Y. Immunoradiometric assay for the N-terminal fragment of proatrial natriuretic peptide in human plasma. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 44, n. 5, p. 1008-1013, May, 1998.

PANOS, M.Z. *et al.* Plasma atrial natriuretic peptide in human fetus: response to intravascular blood transfusion. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 161, n. 2, p. 357-361, Aug., 1989.

PFISTER, R.; SCHNEIDER, C.A. Natriuretic peptides BNP and NT-pro-BNP: established laboratory markers in clinical practice or just perspectives? **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 349, n. 1-2, p. 25-38, Nov., 2004.

PRONTERA, C. *et al.* Natriuretic peptides (NPs): automated electrochemiluminescent immunoassay for N-terminal pro-BNP Compared with IRMAs for ANP and BNP in Heart Failure Patients and Healthy Individuals. **Clinical Chemistry**, Washington CD, v. 49, n. 9, p. 1552-1554, Sep., 2003.

RICHARDS, A.M. *et al.* Renal, haemodynamic and hormonal effects of human alpha atrial natriuretic peptide in healthy volunteers. **The Lancet**, London, v. 8428, n. 1, p. 545-549, Mar., 1985.

RICHARDS, A.M. *et al.* Atrial Natriuretic hormone has biological effects in man at physiological plasma concentrations. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield., v. 67, n. 6, p. 1134-1139, Dec., 1988.

RUBATTU, S.; VOLPE, M. The atrial natriuretic peptide: a changing view. **Journal of Hypertension**, London, v. 19, n. 11, p. 1923-1931, June, 2001.

RUSKOAHO, H. Atrial natriuretic peptide: synthesis, release and metabolism. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 44, n. 4, p. 479-602, Dec., 1992.

RUSKOAHO, H. Cardiac hormones as diagnostic tools in heart failure. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 24, n. 3, p. 341-356, June, 2003.

SATIO, Y. Clinical application of atrial natriuretic polypeptide in patients with congestive heart failure: beneficial effects on left ventricular function. **Circulation**, Dallas, v. 76, n. 1, p. 115-124, July, 1987.

SEIDMAN, C.E. The structure of rat preproatrial natriuretic factor as defined by complementary DNA clone. **Science**, Washington, v. 4.659, n. 225, p. 324-326, July, 1984.

SUDOH, T. *et al.* A new natriuretic peptide in porcine brain. **Nature**, London, v. 6159, n. 332, p. 78-81, Mar., 1988.

SUDOH, T. *et al.* C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 168, n. 2, p. 863-870, Apr., 1990.

SUGA, S.I. *et al.* Receptor selectivity of natriuretic peptide family. Atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide. **Endocrinology**, Springfield, v. 130, n. 1, p. 229-239, Jan., 1992.

TATTERSALL, J.E. *et al.* Immunoradiometric Assay of Atrial Natriuretic Peptide in Unextracted Plasma. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 36, n. 6, p. 855-859, Apr., 1990.

TSUCHIMOCCHI, H. *et al.* Atrial natriuretic peptide in fetal and failed adult human hearts. **Circulation**, Dallas, v. 73, n. 4, p. 920-927, Oct., 1988.

TSUKAHARA, H. *et al.* Vasoactive and natriuretic mediators in umbilical cord blood: a report of our observation and review of the literature. **Early Human Development**, Amstedam, v. 69, n. 1-2, p. 57-64, Oct., 2002.

VILLE, Y. *et al.* Atrial natriuretic factor concentration in normal, growth-retarded, anemic and hydropic fetuses. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v. 171, n. 3, p. 777-783, Sep., 1994.

VOGESER, M.; JACOB, K. B-type natriuretic peptide (BNP): validation of an immediate response assay. **Clinical Laboratory**, Heidelberg, v. 47, n. 1-2, p. 29-33, 2001.

WALTHER, T; STEPAN, H.; FABER, R. Dual natriuretic peptide response to volume load in fetal circulation. **Cardiovascular Research**, London, v. 49, n. 4, p. 817-819, Mar, 2001.

WALTHER, T. *et al.* Natriuretic peptide system in fetal heart and circulation. **Journal of Hypertension**, London, v. 20, n. 5, p. 785-791, Dec., 2002.

WALTHER, T. *et al.* Relation of ANP and BNP to their N-terminal fragments in fetal circulation: evidence for enhanced neutral endopeptidase activity and resistance of BNP to neutral endopeptidase in the fetus. **BJOG: an International Journal of Obstetrics and Gynaecology**, Oxford, v. 111, n. 5, p. 452-455, May., 2004.

WEI, Y. *et al.* Developmental Changes in the rat Atriopeptin Hormonal System. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor MI, v. 79, n. 5, p. 1325-1329, May., 1987.

WILKINS, M.R.; REDONDO, J.; BROWN, L.A. The natriuretic peptide family. **Lancet**, London, v. 349, n. 9061, p. 1307-1310, May., 1997.

WILCOX, J.N. *et al.* Differential regional expression of three natriuretic peptide receptor genes within primate tissues. **Molecular and Cellular Biology**, Washington DC, v. 11, n. 7, p. 3454-3462, July, 1991.

WOODS, R.L. Cardioprotective functions of atrial natriuretic peptide and B-Type natriuretic peptide: a brief review. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Oxford, v. 31, n. 11, p. 791-794, July, 2004.

WU, A.H.B. *et al.* Analytical and Clinical Evaluation of the Bayer ADVIA Centaur Automated B-Type Natriuretic Peptide Assay in Patients with Heart Failure: A Multisite Study. **Clinical Chemistry**, Washington DC, v. 50, n.5, p. 867-873, May, 2004.

YAMAJI, T.; ISHIBASHI, M. TAKAKU, F.; Atrial Natriuretic Factor in Human Blood. **The Journal of Clinical Investigations**, Ann Arbor MI, v. 76, n. 4, p. 1705-1709, Oct., 1985.

YAMAJI, T. *et al.* Atrial natriuretic peptide in umbilical cord blood: evidence for a circulating hormone in human fetus. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Springfield, v. 63, n. 6, p. 1414-1417, Dec., 1986.

YANDLE, T.G. Minisymposium: the natriuretic peptides hormones. Biochemistry of natriuretic peptides. **Journal of Internal Medicine**, Oxford, v. 235, n. 6, p. 561-576, June, 1994.

YANG-FENG, T. L. *et al.* The prodilatin gene is located on the distal short arm of human chromosome 1 and on mouse chromosome 4. **American Journal of Human Genetics**, Baltimore, v. 37, n. 6, p. 1117-1128, Nov., 1985.

# **APÊNDICE E ANEXO**

## APÊNDICE A



### Avaliação da técnica do IRMA para dosagem de peptídeos vasoativos (ANP e BNP) em sangue fetal

#### Consentimento pós-informado

Estamos realizando no Hospital das Clínicas da UFMG a pesquisa intitulada **Avaliação da técnica do IRMA para dosagem de peptídeos vasoativos (ANP e BNP) em sangue fetal**.

O sangue fetal possui substâncias chamadas peptídeos vasoativos que são capazes de informar sobre a gravidade de algumas doenças do feto, principalmente as mal formações cardíacas e os casos de anemia. Estas informações são importantes para escolher o melhor tratamento a ser feito quando o feto tem anemia.

A técnica do IRMA é um exame de laboratório que possibilita a realização de exames com pequena quantidade de sangue ou tecido cardíaco.

Como existe indicação para coleta de sangue do seu feto por causa da anemia, gostaríamos de solicitar a sua autorização para que a parte do sangue que foi retirado e que vai ser jogado fora possa ser usado para realizar a dosagem dos peptídeos vasoativos ANP e BNP.

Caso você não concorde em autorizar este exame não haverá nenhum prejuízo quanto ao seu tratamento ou do seu filho no Hospital das Clínicas.

Os resultados dos exames estarão arquivados e caso você queira ser informada dos mesmo em qualquer momento basta solicitar.

Eu, ....., portadora de documento de identidade nº ....., expedido pela ....., estou ciente do que foi exposto acima e autorizo a retirada de amostra de sangue fetal, durante a transfusão intra-uterina realizada para tratamento desta doença, para esta pesquisa. participo de forma voluntária deste estudo e estou ainda ciente de que a amostra colhida não trará risco à minha saúde ou a de meu bebê, além daqueles próprios da doença e da transfusão intra-uterina, dos quais já estou ciente.

Belo Horizonte, ..... de ..... de .....

*assinatura da paciente*

**Telefone para contato: 031 32489422**

**Maternidade Hospital das Clínicas da UFMG**

**Erika - Bióloga 031 99433979**

**Comitê de ética em pesquisa da UFMG - 031 34994592**

## ANEXO A

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP


Parecer nº. ETIC 089/05

**Interessado: Prof. Dr. Antônio Carlos Vieira Cabral**  
**Departamento de Ginecologia e Obstetria**  
**Faculdade de Medicina - UFMG**

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 15 de junho de 2005, depois de atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado « **Avaliação da Técnica do IRMA para Dosagem de Peptídeos Vasoativos (ANP e BNP) em Sangue Fetal** » bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**