

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Patologia
Área de Concentração em Propedêutica Complementar

Débora Maria Tavares de Andrade

**Validação de ensaios laboratoriais quantitativos
automatizados de dosagem do peptídeo natriurético
tipo B e a fração amino terminal**

Belo Horizonte – Fevereiro de 2009.

Débora Maria Tavares de Andrade

**Validação de ensaios laboratoriais quantitativos
automatizados de dosagem do peptídeo natriurético
tipo B e a fração amino terminal**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre

Área de concentração: Propedêutica Complementar

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal

A553v Andrade, Débora Maria Tavares de.
Validação de ensaios laboratoriais quantitativos automatizados de dosagem do peptídeo natriurético tipo B e fração amino terminal [manuscrito]. / Débora Maria Tavares de Andrade. - - Belo Horizonte: 2009.
116f.: il.
Orientadora: Silvana Maria Elói Santos.
Co-orientador: Pedro Guatimosim Vidigal.
Área de concentração: Propedêutica Complementar.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Peptídeos Natriuréticos/administração & dosagem. 2. Estudos de Validação. 3. Técnicas e Procedimentos de Laboratório. 4. Dissertações Acadêmicas. I. Santos, Silvana Maria Elói. II. Vidigal, Pedro Guatimosim. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 68

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – 2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Professor Ronaldo Tadeu Penna

VICE-REITORA: Professora Heloísa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Jaime Arturo Ramirez

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Professor Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Professor Tarcizo Afonso Nunes

CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

COORDENADOR: Professor Wagner Luis Tafuri

SUB-COORDENADOR: Professor Geovanni Dantas Cassali

MEMBROS DO COLEGIADO:

Prof. Anílton César Vasconcelos

Prof. Edilberto Nogueira Mendes

Profª Helenice Gobbi

Prof. Marcelo Vidigal Caliani

Prof. Wagner Luiz Tafuri

Enio Ferreira (Representante Discente Titular)

Trabalho desenvolvido no Biocor Instituto e no Laboratório de Referência em Diagnósticos Especializados, sob a orientação da Profa. Dra. Silvana Maria Elói Santos¹ e do Prof. Dr. Pedro Guatimosim Vidigal¹.

Colaboradores

Dr. Olindo Assis Martins Filho. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração.

Dra. Andréa Teixeira de Carvalho - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas René Rachou, Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração.

Dr. Guilherme Birchal Collares. Laboratório de Referência em Diagnósticos Especializados – Lab Rede

¹ Departamento de Propedêutia Complementar da Faculdade de Medicina da UFMG.

Apoio financeiro: Fapemig e CNPq

“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito”
(Francisco Cândido Xavier)

*Dedico esta tese aos meus amores Davi, Clara e Daniel,
que compartilham comigo essa maravilhosa estrada da vida
e que me trazem alegrias constantes.*

*Aos meus pais, Hervê e Iraídes, que me deram a vida,
seu amor, amparo e apoio incondicionais e porque
sempre me estimularam para o saber.*

AGRADECIMENTOS

Toda a minha gratidão à minha orientadora Silvana Maria Elói Santos pelo aprendizado, confiança, disponibilidade e atenção, com sua ternura tão marcante. Recebi dela, durante todo o desenvolvimento deste trabalho, orientação segura e objetiva, sempre com apoio incondicional e muito respeito.

Ao professor Pedro Guatimosim Vidigal pela co-orientação, idéias e sugestões indispensáveis para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Biocor Instituto de Doenças Cardiovasculares, nas pessoas de seu diretor e fundador, Dr. Mario Oswaldo Vrandecic Peredo e da Dra. Erika Correa Vrandecic, representante do CEP dessa renomada instituição, pelo apoio na execução de parte do experimento.

Ao Labrede, na pessoa do Dr. Guilherme Birchal Collares, pelo apoio na execução de parte do experimento.

Ao colega, amigo e parceiro Dr. Guilherme Birchal Collares, pelo apoio e auxílio nas horas da estatística.

Ao colega, Dr. Mauro Nogueira Cardoso, pela orientação ministrada na estatística deste trabalho.

Ao Davi, meu marido e grande amigo, pela ajuda inestimável com a informática, pela paciência e temperança marcantes.

Ao coordenador do setor de informática do laboratório Analys, Décio Manoel Vaz, pela ajuda inestimável com a informática.

Ao meu irmão, prof. Dr. Stéfano J. T. de Andrade, pelas dicas e pela ajuda inestimável na parte conclusiva deste trabalho.

À professora Angélica Alves Lima, da Universidade Federal de Ouro Preto, pelas dicas importantes no início deste trabalho.

Aos assessores da Abbott Diagnostica, Claudio Brito e Adriano Rodrigues.

À Abbott Diagnostica, pelo fornecimento de kits sem ônus para a realização de parte deste trabalho.

Aos professores do programa de Pós-graduação da Patologia, representado pelos coordenadores Profs. Dr. Giovanni Cassali e Dr. Wagner Tafuri pela convivência e pelos ensinamentos ministrados no curso.

Aos colegas de turma da Pós Graduação, pelos momentos de agradável convivência, especialmente, José Nelson Mendes Vieira

Agradeço às amigas especiais Cibele Tanigaki, Daisy Renault, Flavia Massote, Lucienne França, Daia Seniuk e Alexandra Martins, que me ampararam nesse ano tão desafiante que foi 2008.

À equipe de cardiologia e cirurgia cardíaca do Biocor Instituto, pela colaboração.

A todos, que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, meu especial agradecimento.

Aos pacientes, pela contribuição ao conhecimento científico.

À Clara e ao Daniel, pelo tempo que abdicaram da minha companhia e mesmo assim, continuam me recebendo com sorrisos e carinhos.

Resumo

Atualmente, as determinações de peptídeo natriurético tipo B (BNP) endógeno e da fração N-terminal pro-peptídeo natriurético cerebral (NT-proBNP) são largamente utilizadas no diagnóstico, prognóstico e avaliação da insuficiência cardíaca. Entretanto, dados da literatura são insuficientes quanto ao desempenho dos métodos e estabilidade dos analitos sob diferentes condições de armazenamento rotineiramente empregadas.

Métodos: Seguindo protocolo EP15-A do NCCLS modificado para estudo de validação, calculamos os coeficientes de variação intraensaio (CV_I) e total (CV_T) e a porcentagem de recuperação dos peptídeos natriuréticos endógenos em triplicatas de amostras, congeladas e refrigeradas, de pacientes classificados segundo NYHA, ensaiadas em 3 dias consecutivos empregando o ensaio imunoenzimático de micropartículas de BNP (BNP MEIA[®]) e o ensaio imunoquimioluminescente de NT-proBNP (NT-proBNP QIA[®]).

Resultados: Considerando o ensaio BNP MEIA[®], os percentuais de CV_I médios variaram de 6.89 até 16.28 e de CV_T de 13.22 até 32.35 para amostras congeladas. Para as amostras refrigeradas, o CV_I variou de 9.78 até 13.67 e o CV_T de 13.75 até 50.76. O índice de recuperação, nas duas formas de armazenamento, variou de 0.35 até 0.98. Para ensaio NT-proBNP QIA[®], o CV_I variou de 1.19 até 2.47 e o CV_T de 2.28 até 5.67 para amostras congeladas. Para as refrigeradas, o CV_I variou de 0.55 até 0.78 e o CV_T de 0.9 até 1.76. O índice de recuperação foi próximo de 1 nas duas formas de armazenamento.

Conclusão: Nossos dados demonstraram que a recuperação do BNP foi estatisticamente menor, tanto em amostras congeladas, quanto nas refrigeradas, que a recuperação do NT-proBNP num período de 48 horas. Ainda, os coeficientes de variação intraensaio (CV_I) do ensaio BNP MEIA[®], tanto em amostras refrigeradas, quanto nas congeladas, foram estatisticamente superiores aos observados no ensaio NT-proBNP QIA[®]. Isso implica em abrangência de utilizações diferentes, indicando o uso de ensaios de melhor desempenho para categorização e monitorização de tratamento.

Palavras-chave: peptídeos natriuréticos, armazenamento, validação, coeficiente de variação, estabilidade.

Abstract

Background: The measurement of endogenous B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal proBNP (NT-proBNP) are largely used nowadays in diagnosis, prognosis, and treatment of heart failure. Nevertheless, insufficient data in literature related to assays performances and long-term stability on different storage conditions of natriuretic peptides are available.

Methods: For validation data, following modified NCCLS EP15-A protocol, we calculated coefficients of variation within-run (CV_I), total (CV_T) and recovery index percentage of endogenous natriuretic peptides from triplicates of frozen and refrigerate samples from categorized NYHA patients, in three sequential days using BNP MEIA[®] and NT-proBNP QIA[®].

Results: Considering BNP-MEIA[®] assay, the percentage of average CV_I ranged from 6.89 to 16.28 and CV_T from 13.22 to 32.35 for frozen samples. For refrigerate samples, CV_I ranged from 9.78 to 13.67 and CV_T from 13.75 to 50.76. The recovery index percentage, in both storage conditions, ranged from 0.35 to 0.98. For NT-proBNP-QIA[®] assay, CV_I ranged from 1.19 to 2.47 and CV_T from 2.28 to 5.67 for frozen samples. For refrigerate samples, CV_I ranged from 0.55 to 0.78 and CV_T from 0.9 to 1.76. The recovery index percentage was nearest 1 in both storage conditions.

Conclusions: Our data showed recovery index percentage statistically lower from BNP, in refrigerate and frozen samples, than NT-proBNP, in a time of 48 hours. In addition, coefficient of variation within-run (CV_I) of BNP-MEIA[®] assay in refrigerate and frozen plasma, were statistically highest from values observed in NT-proBNP-QIA[®] assay. These data must be considered when using these assays to evaluate patient categorization and treatment.

Keywords: natriuretic peptides, storage, validation, coefficient of variation, stability.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 1 Alíquotas congeladas.....	41
TABELA 2	Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 2 Alíquotas congeladas.....	44
TABELA 3	Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 2 Alíquotas refrigeradas.....	44
TABELA 4	Comparação da variação dos CV_I médios do ensaio do BNP MEIA das triplicatas de alíquotas congeladas x refrigeradas...	45
TABELA 5	Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio NT-proBNP QIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 2-Alíquotas congeladas.....	47
TABELA 6	Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio NT-proBNP QIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 2-Alíquotas refrigeradas.....	48
TABELA 7	Comparação da variação dos CV_I médios do ensaio do NT-proBNP QIA das triplicatas de alíquotas congeladas x refrigeradas.....	49
TABELA 8	Comparação dos valores médios de CV_I do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas congeladas e de alíquotas refrigeradas	50
TABELA 9	Comparação dos valores médios de CV_I do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas, congeladas e refrigeradas.....	50
TABELA 10	Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas congeladas e de alíquotas refrigeradas.....	51
TABELA 11	Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas, congeladas e refrigeradas.....	51
TABELA 12	Comparação entre os valores de CV_I e CV_T do BNP MEIA e de NT-proBNP QIA em amostras congeladas e refrigeradas, nas três classes funcionais (experimento 2).....	52
TABELA 13	Percentual de recuperação em relação ao dia 1 BNP MEIA - Experimento 1- alíquotas congeladas	53
TABELA 14	Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA. Experimento 1-Alíquotas congeladas.....	54
TABELA 15	Percentual de recuperação em relação ao dia 1 BNP MEIA. Experimento 2-Alíquotas congeladas e refrigeradas.....	55

TABELA 16	Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA. Experimento 2-Alíquotas congeladas.....	56
TABELA 17	Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA. Experimento 2-Alíquotas refrigeradas.....	57
TABELA 18	Percentual de recuperação em relação ao dia 1 NT-proBNP QIA - Experimento 2- alíquotas congeladas e refrigeradas.....	58
TABELA 19	Detalhamento da análise estatística dos valores de NT-proBNP QIA. Experimento 2-Alíquotas congeladas.....	59
TABELA 20	Detalhamento da análise estatística dos valores de NT-proBNP QIA. Experimento 2-Alíquotas refrigeradas.....	60
TABELA 21	Comparação entre os percentuais de recuperação dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA	61
TABELA 22	CV_I médios dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA nos experimentos 1 e 2.....	62
TABELA 23	CV_T médios dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA nos experimentos 1 e 2.....	62
TABELA 24	Percentual de recuperação dos analitos em relação a tempo e forma de estocagem.....	63
TABELA 25	Resultados de desempenho dos ensaios de BNP MEIA e NT-proBNP QIA dos trabalhos de Muller et al, Andrade et al e fabricantes Abbott (BNP) e Roche (NT-proBNP).....	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura molecular dos peptídeos naturéticos.....	5
Figura 2	Representação esquemática da decodificação genética e síntese dos fragmentos BNP e NT-proBNP a partir da molécula de Pré-proBNP.....	6
Figura 3	Representação dos Receptores dos peptídeos natriuréticos (NPR).....	7
Figura 4	Fluxograma do delineamento experimental	34
Figura 5	Experimento 1: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), Classe III (c) e Classe IV (d) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.....	40
Figura 6	Experimento 2: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.....	42
Figura 7	Experimento 2: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas refrigerados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.....	43
Figura 8	Experimento 2: Valores individuais de NT-proBNP de triplicatas de soros congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.....	46
Figura 9	Experimento 2: Valores individuais de NT-proBNP de triplicatas de soros refrigerados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.....	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Número de internações por insuficiência cardíaca por regiões brasileiras.....	1
QUADRO 2	Resumo dos estudos de variação biológica – Wu 2006.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ANP: peptídeo natriurético atrial

BNP: peptídeo natriurético cerebral

CNP: peptídeo natriurético tipo C

DATASUS: Banco de dados do Sistema Único de Saúde

DNP: peptídeo natriurético dendroaspis

CV_G: coeficiente de variação inter-ensaio

CV_I: coeficiente de variação intra-ensaio

CV_T: coeficiente de variação total

GMP- cíclico: guanosina 3', 5'-cíclica monofosfato

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IFCC C-SMCD: International Federation of Clinical Chemistry Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage

IUPAC: International Union of Pure and Applied Chemistry

MEIA: ensaio imunoenzimático de micropartículas

NACB: National Academy of Clinical Biochemistry

NCCLS: National Committee Laboratory Standardization

NPR: receptor do peptídeo natriurético

NPR-A: receptor do peptídeo natriurético do tipo A

NPR-B: receptor do peptídeo natriurético do tipo B

NPR-C: receptor do peptídeo natriurético do tipo C

NPR-1: gene que codifica o receptor NPR-A

NT-ANP: fração N terminal do peptídeo natriurético tipo A

NT-proBNP: fração N terminal do pre-proBNP

NYHA: New York Heart Association

OMS: Organização Mundial de Saúde

ONA: Organização Nacional de Acreditação

pg/mL: picogramas por mililitro

Pré-proBNP: precursor do peptídeo natriurético cerebral

RCV: reference change value

RNA: ácido ribonucléico

QIA: ensaio imunoenzimático quimioluminescente

TNF-alfa: fator de necrose tumoral tipo alfa

VB_i: variação biológica intra-individual

VE: ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

1	Introdução.....	1
2	Revisão Bibliográfica.....	2
2.1	Peptídeos natriuréticos.....	2
2.1.1	Histórico.....	2
2.1.2	Estrutura molecular do BNP.....	5
2.1.3	Receptores moleculares dos peptídeos natriuréticos.....	6
2.1.4	Ações do BNP.....	7
2.1.5	Síntese do BNP.....	8
2.1.6	Mecanismos de eliminação do BNP.....	10
2.1.7	Valores de referência e variáveis no nível sérico do BNP.....	11
2.2	Níveis séricos de BNP e a classificação NYHA (New York Heart Association).....	12
2.3	Valores de corte dos níveis séricos de BNP para diagnóstico de insuficiência cardíaca.....	13
2.4	Aplicações clínicas da determinação dos níveis séricos de BNP e NT-proBNP.....	14
2.5	Estabilidade dos peptídeos natriuréticos.....	18
2.6	Precisão dos ensaios.....	21
2.7	Hipóteses.....	32
3	Objetivos.....	33
3.1	Objetivo geral.....	33
3.2	Objetivos específicos.....	33
4	Material e Métodos.....	34
4.1	Delineamento experimental.....	34
4.2	Amostras.....	35
4.3	Estudos de estabilidade e precisão.....	35
4.4	Ensaio.....	36
4.5	Análise estatística.....	38
4.6	Considerações éticas.....	38
5	Resultados.....	39
5.1	Determinação dos coeficientes de variação intraensaio (CV_I) e total (CV_T) do imunoensaioenzimático de micropartículas BNP MEIA® (Abbott).....	39

5.2	Determinação dos coeficientes de variação intraensaio (CV_I) e total (CV_T) do imunoensaioenzimático quimioluminescente NT-proBNP QIA [®] (Roche).....	45
5.3	Comparação entre o desempenho dos dois ensaios.....	49
5.4	Estudo da estabilidade do BNP.....	53
5.5	Estudo da estabilidade do NT-proBNP.....	57
5.6	Síntese dos resultados.....	62
6	Discussão	64
7	Conclusões	75
8	Considerações finais	76
9	Referências Bibliográficas	78
10	Anexos	83

1. – Introdução

A insuficiência cardíaca ou falência cardíaca pode ocorrer em consequência de qualquer condição passível de reduzir a capacidade de bombeamento de sangue pelo coração para suprir as necessidades do organismo de sangue e oxigênio (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005).

Segundo a Sociedade Européia de Cardiologia (European Society of Cardiology, 2003), aproximadamente 14 milhões de indivíduos são portadores de insuficiência cardíaca, na Europa, e mais de 3,5 milhões de casos novos surgem anualmente. Nos Estados Unidos da América do Norte, dos 70 milhões de americanos com um ou mais tipos de doença cardiovascular, aproximadamente 5 milhões apresentam insuficiência cardíaca e são estes os responsáveis pelos maiores custos em medicina (Heart Disease Estatistic - AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2005).

No Brasil, os dados obtidos no DATASUS informam que, no período de janeiro a novembro de 2008, o número de internações, tendo como causa a insuficiência cardíaca, foi de 245.214. O quadro 1 mostra esses dados, por região.

QUADRO 1

Número de internações por insuficiência cardíaca por regiões brasileiras

Região	Internações
Região Norte	13.685
Região Nordeste	56.836
Região Sudeste	102.609
Região Sul	52.805
Região Centro-Oeste	19.279
Total	245.214

Lista Morbidade CID 10: Insuficiência cardíaca

A insuficiência cardíaca representa um estado patológico que compreende alterações cardíacas, renais e neuro-hormonais complexas. Níveis aumentados de neuro-hormônios vasoconstritores tais como norepinefrina, angiotensina II, endotelina I e de algumas citocinas como fator de necrose tumoral (TNF-alfa), têm sido relacionados como importantes preditores prognósticos na insuficiência cardíaca, sugerindo um importante papel desses hormônios na patogênese da doença. Contudo, a utilização da dosagem sérica dessas substâncias, como marcadores do processo patológico, falhou pela dificuldade de padronizar ensaios reprodutíveis. Uma explicação seria a instabilidade dessas moléculas e a grande variabilidade biológica natural que levam a grandes intervalos de referência, como observado nas dosagens de citocinas, tais como TNF-alfa (MAISEL et al, 2001).

A busca por melhores marcadores que caracterizassem a insuficiência cardíaca e com isso facilitasse o seu diagnóstico levou à pesquisa de outros fatores solúveis, destacando a família dos peptídeos natriuréticos vasodilatadores, que nos últimos anos, vêm desempenhando esse papel na propedêutica cardiológica (MAISEL et al, 2001).

2 – Revisão Bibliográfica

2.1 – Peptídeos natriuréticos

2.1.1 – Histórico

Uma série de experimentos realizados na década de 1950 estabeleceu o coração como um órgão endócrino responsável pela síntese de mediadores

com efeitos natriuréticos e diuréticos. Vários experimentos iniciados naquela época realizados em cobaias e cães foram corroborados por outros realizados em ratos, nas décadas de 80 e 90, onde se identificou a estrutura dos peptídeos natriuréticos (LEMOS et al, 2003).

Na eventualidade de uma lesão cardíaca, observa-se queda do débito cardíaco e conseqüentemente, vários neuro-hormônios são ativados com a finalidade de restaurar a homeostase circulatória. Na síndrome da insuficiência cardíaca, independentemente da sua etiologia, há retenção de sais e água inicialmente devida à queda da pressão arterial. Posteriormente ocorre ativação de dois grupos de neuro-hormônios mediados pelos barorreceptores, com efeitos opostos: hormônios vasoconstritores, tais como norepinefrina, angiotensina II e endotelina que são também antinatriuréticos e antidiuréticos e geralmente têm atividade promotora de crescimento celular; e hormônios vasodilatadores, tais como peptídeos natriuréticos, prostaglandinas e o sistema das cininas que são natriuréticos e diuréticos e tem efeitos antimitogênicos (LATINI et al, 2002). Na insuficiência cardíaca, os efeitos natriuréticos e vasodilatadores são sobrepostos por influências que levam à vasoconstrição, retenção de sal e água e crescimento celular anormal. Assim, a progressão da insuficiência cardíaca associa-se ao remodelamento ventricular, um processo pouco compreendido, mas comumente relacionado com a ativação neurohormonal. De acordo com essa hipótese, a ativação neurohormonal na insuficiência cardíaca é inicialmente uma resposta adaptativa e benéfica. Eventualmente, contudo, com a produção excessiva dos neuro-hormônios, se transforma num agravamento da insuficiência cardíaca através de vários mecanismos que

incluem morte de miócitos por apoptose e necrose, fibrose miocárdica com remodelamento contínuo do ventrículo esquerdo (LATINI et al, 2002).

Baseando-se nessa hipótese fisiopatológica, a detecção dos peptídeos natriuréticos passou a ter um importante papel no diagnóstico, na otimização e monitoramento do tratamento da insuficiência cardíaca (MAISEL et AL, 2001; LATINI et al, 2002; FERNANDES et al, 2003; WEBER and HAMM, 2006).

Os peptídeos natriuréticos têm duas características que os distinguem dos outros neuro-hormônios: apresentam efeitos benéficos na insuficiência cardíaca e são predominantemente produzidos e secretados no coração (LATINI et al, 2002). Os peptídeos natriuréticos, embora com estrutura similar, se diferem geneticamente e funcionalmente na homeostasia cardiovascular, renal e endócrina, e a insuficiência cardíaca representa o estado patológico no qual a ativação dos peptídeos natriuréticos excede todos os outros (CHEN et BURNETT, 1999). Atualmente, vários membros da família dos peptídeos natriuréticos são conhecidos: o peptídeo natriurético cerebral (BNP), o peptídeo natriurético atrial (ANP), o peptídeo natriurético C (CNP), o dendroaspis NP (DNP), o V-peptídeo e a urodilatina (CHEN et BURNETT, 1999; WU et al, 2004; WEBER et HAMM, 2006; LIPPI et al, 2007). Desses, os dois primeiros são de origem miocárdica, o CNP tem origem endotelial e os últimos não há relato na literatura de relevância na insuficiência cardíaca (LATINI et al, 2002).

O BNP, ou peptídeo natriurético cerebral, foi descrito primeiramente em 1988 após isolamento em tecido cerebral de porco, mas foi logo caracterizado como sendo de produção principalmente pelo coração, sendo considerado um hormônio cardíaco (WEBER et HAMM, 2006). O ANP foi identificado em 1984 e o CNP em 1990 (LEMOS et al, 2003).

2.1.2 – Estrutura molecular do BNP

Todos os membros da família dos peptídeos têm em comum uma estrutura similar em anel de 17 aminoácidos, sendo que 8 formam um núcleo preservado (LATINI et al, 2002), com uma ponte dissulfídica entre duas moléculas de cisteína (WEBER et HAMM, 2006).

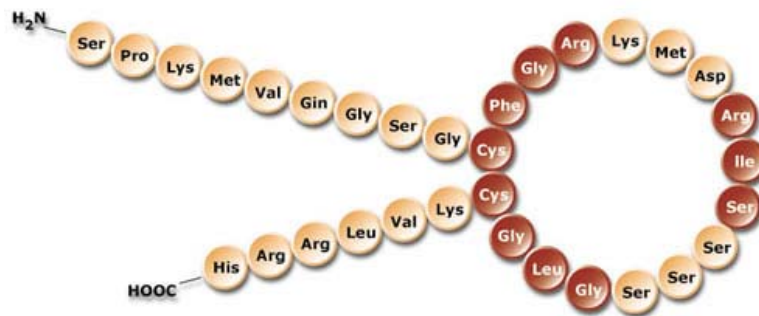


Figura 1 - Estrutura molecular dos peptídeos natriuréticos

O BNP é liberado a partir da clivagem enzimática do precursor pré-proBNP, contendo 134 aminoácidos, em uma fração amino terminal proBNP (NT-proBNP) com 76 aminoácidos, e em BNP, com 32 aminoácidos (77 a 108) da porção C terminal, que é a porção fisiologicamente ativa (LATINI et al, 2002; WEBER et HAMM, 2006).

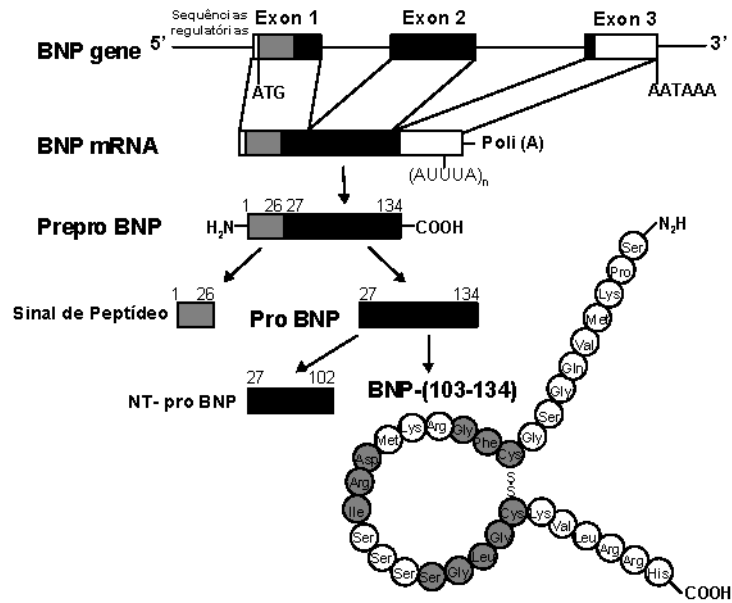


Figura 2: Representação esquemática da decodificação genética e síntese dos fragmentos BNP e NT-proBNP a partir da molécula de pre-proBNP.

2.1.3 – Receptores moleculares dos peptídeos natriuréticos

Três proteínas transmembranas com funções de receptores para os peptídeos natriuréticos (NPR – *natriuretic peptide receptor*) já foram identificados: NPR-A, NPR-B e NPR-C.

Os receptores A e B possuem atividade de guanilato ciclase e estão relacionados à ação dos peptídeos. A ligação dos peptídeos aos receptores A e B na superfície das células-alvo leva à geração do segundo mensageiro, GMP cíclico, que medeia a maioria dos efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos. O ANP e o BNP se ligam preferencialmente ao receptor peptídico natriurético A (NPR-A), enquanto o CNP se liga ao segundo. O CNP não possui ação natriurética, mas tem ações vasodilatadoras e antimitogênicas (CHEN et BURNETT, 1999; SCHMITT et al, 2003). O receptor C está relacionado ao clareamento dos três peptídeos natriuréticos, determinando seu catabolismo e,

desta maneira, regulando seus níveis plasmáticos e/ou sua concentração tecidual.

Ao contrário da maioria das guanilato ciclase citoplasmáticas, as ciclases associadas aos receptores dos peptídeos natriuréticos não são ativadas pelo óxido nítrico (MAISEL et al, 2001; LATINI et al, 2002).

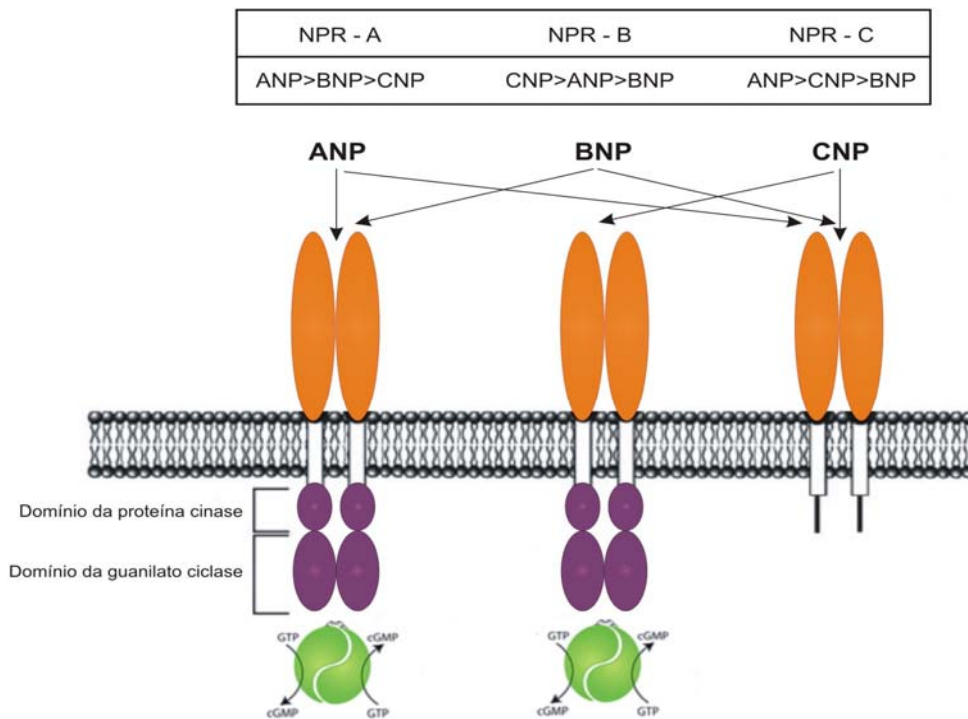


Figura 3: Representação dos receptores dos peptídeos natriuréticos (NPR)
 Notar que todos os três receptores tem um domínio extracelular de ligação, tanto quanto os segmentos transmembrana NPR-A e NPR-B que também contém uma região homóloga à proteína cinase, que parece exercer alguma função regulatória no domínio guanilato ciclase (GC).

2.1.4 – Ações do BNP

As ações do BNP, assim como do ANP, são opostas às da angiotensina II. Ambos provocam natriurese mediada pela inibição do transporte do sódio no ducto coletor, vasodilatação venosa e arterial pelo relaxamento da musculatura lisa e diminuição do retorno venoso. Também induzem inibição do sistema

simpático-adrenal por estímulo dos aferentes vagais, a despeito de queda da pressão de enchimento cardíaca, e inibição do sistema renina-angiotensina-aldosterona por vários mecanismos. Em comum com o ANP, o BNP diminui a secreção de renina e reduz a quantidade de aldosterona liberada mediada pela angiotensina II. Inibe também a proliferação da musculatura lisa muscular, potencializa a formação de GMP cíclico e apresenta propriedades lusitrópicas (relaxamento do miocárdio).

Além disso, os peptídeos natriuréticos têm efeitos benéficos na disfunção endotelial secundária ao processo aterosclerótico, tanto pela diminuição da tensão de cisalhamento da parede do vaso, quanto pela regulação da coagulação e fibrinólise e inibição da ativação plaquetária. Todas essas funções podem ser consideradas um mecanismo de resposta adaptativa e potencialmente protetor na doença cardiovascular (CHEN et BURNETT, 1999; LATINI et al, 2002; SCHMITT et al, 2003; LEMOS et al, 2003, CLERICO et EMDIN, 2004).

2.1.5 – Síntese do BNP

Alguns autores relataram que miócitos atriais e ventriculares são capazes de sintetizar BNP. Outros autores relataram que ao contrário do ANP, cujos maiores sítios de estoque incluem o átrio, as maiores fontes do BNP plasmático são os ventrículos (CHEN et BURNETT, 1999; MAISEL et al, 2001; WEBER et HAMM, 2006).

O ANP está contido em grânulos de estocagem e, estímulos menores tais como exercícios, podem levar à significativa liberação desse peptídeo na

circulação. Por outro lado, o BNP fica minimamente estocado em grânulos, sendo imediatamente liberado após a sua síntese (WEBER et HAMM, 2006). O turnover de seu RNA mensageiro é alto e seu gene contém a seqüência desestabilizante TATTTAT (MAISEL et al, 2001). Isso sugere que o BNP possa ser um indicador mais sensível e mais específico das desordens ventriculares que outros peptídeos natriuréticos (MAISEL et al, 2001).

O maior estímulo para a síntese é a sobrecarga de volume ou outras condições que causam distensão das fibras cardíacas (LATINI et al, 2002). Entretanto, fatores tais como isquemia miocárdica e modulação endócrina (parácrina) por outros neuro-hormônios e citocinas também são importantes como estímulo (WEBER et HAMM, 2006).

A síntese também pode estar aumentada por taquicardia e ação de glicocorticóides, hormônios tireoidianos e peptídeos vasoativos, tais como endotelina-I e angiotensina II, independente dos efeitos hemodinâmicos desses fatores (MAISEL et al, 2001).

Em pacientes com insuficiência cardíaca ou infarto do miocárdio, o BNP aumenta significativamente, inclusive ultrapassando os níveis de ANP. Apesar de o fator mecânico ser o mais importante para o aumento do BNP, é provável que a necrose miocárdica também contribua para este fenômeno. Em pacientes infartados, a produção de BNP pela região infartada é significativamente maior do que nas áreas não infartadas (LATINI et al, 2002). A extensão do aumento é relacionada ao tamanho do infarto. Pacientes com infartos pequenos tendem a ter um aumento monofásico, com pico 20 horas após o início dos sintomas. Por outro lado, aqueles com grandes infartos e sinais clínicos de insuficiência cardíaca, podem se apresentar com um pico

adicional até 5 dias após a admissão. Como os trabalhos mostram resultados conflitantes quanto ao desempenho da dosagem dos peptídeos natriuréticos para identificar pacientes com dano ventricular significativo após infarto, os ensaios em questão parecem ser apenas moderadamente úteis para avaliar disfunção ventricular após infarto do miocárdio. Entretanto, aumentos persistentes dos peptídeos natriuréticos por um a dois meses após o infarto do miocárdio sugerem maior risco de remodelamento adverso e subsequente insuficiência cardíaca, embora esses achados devam ser confirmados ainda por estudos adicionais melhor desenhados (CLERICO et EMDIN, 2004). Estudos realizados em maratonistas relataram que os níveis de BNP aumentam após maratona, sugerindo que exercícios intensos poderiam causar injúria cardíaca, liberando não só o BNP, mas também a troponina T (LATINI et al, 2002).

2.1.6 – Mecanismos de eliminação do BNP

O BNP é eliminado na circulação através de dois mecanismos: clivagem pelas endopeptidases neurais e endocitose mediada pelo receptor específico C (NPR-C) (SEYMOUR et al, 1995; CHEN et BURNETT, 1999; ANAND-SRIVASTAVA, 2005). As endopeptidases neurais são do tipo metalopeptidases dependentes de zinco e estão amplamente distribuídas no corpo. Encontram-se particularmente concentradas nos pulmões, na borda em escova das células dos túbulos proximais dos rins, na superfície das células endoteliais, nas células musculares lisas, nos fibroblastos e nos neutrófilos (SHIMIZU et al, 2001; LATINI et al, 2002). Sua presença nos rins explicaria o aumento nos níveis dos peptídeos circulantes em casos de insuficiência renal.

Em relação à eliminação via endocitose mediada pelo receptor específico C, sabe-se que o BNP apresenta menor afinidade ao receptor que o ANP, o que contribuiria para sua maior meia-vida (LEMOS et al, 2003).

O segmento NT-proBNP, ao contrário, é eliminado principalmente pela excreção renal, mas alguns estudos já aventam a possibilidade de existir outra importante forma de eliminação (WEBER et HAMM, 2006).

2.1.7 – Valores de referência e variáveis interferentes no nível sérico do BNP

Estudos populacionais mostram que indivíduos normais apresentam níveis séricos de BNP inferiores a 100 pg/mL (MAISEL et al, 2001; LEMOS et al. 2003; JANUZZI et al, 2005; LIPPI et al. 2007; FDA, 2008).

Diferentes variáveis biológicas influenciam os valores séricos de BNP, como idade, sexo e massa corporal (MEHRA et al, 2004; WANG et al. 2002, 2004).

Os níveis de BNP aumentam com a idade. Utilizando metodologia imunoradiométricas, Maisel e colaboradores descreveram os seguintes valores médios de BNP: para indivíduos entre 55-64 anos, $26,2 \pm 1,8$ pg/mL; para indivíduos entre 65-74 anos, $31,0 \pm 2,4$ pg/mL, e para indivíduos acima de 75 anos, $63,7 \pm 6$ pg/mL (MAISEL et al, 2001).

Mulheres saudáveis também têm níveis mais altos de BNP comparando-se com grupos de homens da mesma idade. Embora a razão seja desconhecida, é possível que mulheres idosas tenham ventrículos esquerdos mais rígidos do que homens da mesma faixa etária.

Níveis de BNP são significativamente mais baixos em obesos do que não obesos e admite-se que haja degradação de BNP pelo tecido adiposo. Essa diminuição de BNP nos obesos poderia explicar a retenção aumentada de sódio, a expansão de volume, a hipertensão e o menor antagonismo ao sistema renina-angiotensina-aldosterona relacionados à obesidade (WANG et al. 2004).

Os níveis de BNP estão também aumentados nos estágios finais da doença renal e em virtualmente todos os pacientes em tratamento dialítico. Parte desse aumento pode ser provocada pelo aumento da volemia, pois após diálise, os níveis de BNP reduzem significativamente, embora não para níveis normais (MAISEL et al, 2001).

2.2 – Níveis séricos de BNP e a classificação NYHA (New York Heart Association)

A classificação funcional da New York Heart Association (NYHA) proporciona um meio simples de categorizar a extensão da insuficiência cardíaca. Classifica os doentes em quatro categorias baseando-se na quantificação da limitação da atividade física. Embora apresente boa correlação da sintomatologia com a mortalidade, trata-se de uma classificação subjetiva. Tem sido proposta a utilização de parâmetros mais objetivos.

Os níveis de BNP se correlacionam significativamente com parâmetros hemodinâmicos, tais como pressão atrial direita, pressão de enchimento capilar pulmonar e pressão diastólica final do ventrículo esquerdo. Como os níveis de BNP se correlacionam com a elevação da pressão diastólica final e essa se

correlaciona intimamente com o sintoma principal da insuficiência cardíaca que é a dispnéia, não é surpreendente que o BNP se correlacione intimamente com a classificação da NYHA.

Embora haja significativa sobreposição nos níveis de BNP entre as quatro classificações da insuficiência cardíaca, quanto maior a gravidade da doença cardíaca, mais altos são os níveis de BNP (MAISEL et al, 2001). Pacientes em classe funcional I apresentam níveis médios de BNP de 152 ± 16 pg/mL, os de classe II de 332 ± 25 pg/mL, os de classe III de 590 ± 31 pg/mL e os de classe IV de 960 ± 34 pg/mL (MAISEL et al, 2001; EWALD et al, 2008). Em qualquer uma das classes funcionais, as mulheres apresentam níveis ligeiramente mais altos que os homens (MAISEL et al, 2001).

2.3 – Valores de corte dos níveis séricos de BNP para diagnóstico de insuficiência cardíaca

Alguns autores sugerem que o valor de corte para o BNP de 100 pg/mL poderia ser utilizado para discriminar pacientes com insuficiência cardíaca. Esse valor teria 82,4% de sensibilidade em geral e acima de 99% na classe IV da NYHA, com especificidade variando de 93 a 95% (GUIMARÃES, 2002). Existe também a recomendação do uso de dois valores de corte, um entre 40-60 pg/mL e outro em torno de 100 pg/mL. Essa recomendação, segundo Maisel e colaboradores (2001), postula que usando um valor de cutoff mais alto (100 pg/mL), o teste de BNP teria maiores especificidade e valor preditivo positivo, enquanto que um valor de cutoff mais baixo proporcionaria maiores sensibilidade e valor preditivo negativo. Esse valor de cutoff mais baixo poderia ser muito importante no *screening* das populações de alto risco. Pacientes com disfunção ventricular

esquerda assintomática (sistólica ou diastólica) que estariam na classificação da NYHA Classe I cairiam nessa faixa de BNP (MAISEL et al, 2001).

Estudos recentes mostram que a dosagem do peptídeo NT-proBNP se comporta de forma equivalente ao BNP tanto no diagnóstico, prognóstico e seguimento dos pacientes com insuficiência cardíaca (WEBER et HAMM, 2006).

Em geral, a insuficiência cardíaca é improvável em valores de BNP inferior a 100 pg/mL e muito provável em valores superiores a 500 pg/mL e para o NT-proBNP improvável em valores inferiores a 300 pg/mL e muito provável em valores superiores a 450 pg/mL até 50 anos e superiores a 900 pg/mL para pacientes acima de 50 anos (WEBER et HAMM, 2006).

As medidas dos níveis de BNP e NT-proBNP têm elevado valor preditivo negativo (98%) na disfunção ventricular, sugerindo que pacientes com níveis dentro da faixa de referência, muito provavelmente, apresentem função normal (MAISEL et al, 2001; FERNANDES, 2003), demonstrando que a melhor utilidade desses marcadores é excluir o diagnóstico de insuficiência cardíaca (WEBER et HAMM, 2006).

2.4 – Aplicações clínicas da determinação dos níveis séricos de BNP e NT-proBNP

Os peptídeos natriuréticos têm sido considerados bons marcadores bioquímicos para triagem diagnóstica e classificação, diagnóstico diferencial da dispnéia, avaliação do tratamento e prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC). Eles têm sido largamente utilizados como

marcadores de morbidade e mortalidade em doenças cardíacas (CLERICO et EMDIN, 2004, MAISEL et al, 2001). Permitem também melhor triagem dos pacientes encaminhados para realização de ecocardiograma, evitando ou reduzindo a utilização de outros exames caros ou desnecessários, uma vez que valores normais de NT-proBNP ou BNP praticamente excluem disfunção ventricular (CLERICO et EMDIN, 2004). A Sociedade Européia de Cardiologia tem recomendado que se os níveis dos peptídeos estiverem dentro dos valores de referência, dispensa-se a realização de outros procedimentos ou mais dispendiosos, ou mais demorados, como é o caso do ecoardiograma e teste ergométrico (Wu et al, 2004).

Além disso, a partir do tratamento, podem funcionar como marcadores de risco (morbidade e mortalidade) em longo prazo dependendo da resposta do paciente ao tratamento. A estreita correlação dos níveis séricos do BNP com a condição clínica cardíaca permite também sua utilização na otimização do tratamento medicamentoso da insuficiência cardíaca (MAISEL et al, 2001). Estudos clínicos demonstram que esta abordagem é superior à terapêutica clínica empírica convencional (JANUZZI et al, 2005; WEBER et HAMM, 2006; EWALD et al, 2008; OMLAND, 2008).

No Brasil, tem sido preconizada a dosagem de peptídeos natriuréticos para definição da forma cardíaca da doença de Chagas. A cardiopatia chagásica é uma causa importante, no Brasil, de insuficiência cardíaca (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 1995; MCKENNA, 1996; HERINGER-WALTER et al, 2003). O paciente na fase crônica da doença de Chagas pode ter insuficiência cardíaca em graus variados como complicação da miocardiopatia dilatada decorrente da inflamação e destruição mioneural.

A doença de Chagas é a doença de saúde pública mais desafiante na América Latina e a quarta maior causa entre as doenças transmissíveis, onde estimativas recentes indicam uma prevalência da infecção de 16 a 18 milhões, com 3 a 3,3 milhões de casos sintomáticos. No Brasil, existem 6 a 8 milhões de pessoas infectadas. A forma cardíaca da doença de Chagas pode se manifestar de forma assintomática, sem evidência de insuficiência cardíaca, como cardiomiopatia dilatada com ou sem insuficiência cardíaca, ou ainda como forma arritmogênica de vários padrões (MELO et al, 2004; RIBEIRO et al, 2005). O ecocardiograma é a melhor técnica não invasiva usada na avaliação da função ventricular nessa doença. Entretanto, há várias limitações para o seu uso frequente, especialmente pela dificuldade na sua execução em zonas rurais, onde a doença é endêmica, além da necessidade de um examinador experiente. Portanto, o desenvolvimento de um método de triagem alternativo para a detecção da disfunção ventricular esquerda, ainda em fase incipiente, é extremamente desejável (RIBEIRO et al, 2005).

Os níveis de BNP se correlacionaram com piora da função ventricular em pacientes portadores de doença de Chagas, pois pacientes com maior grau de insuficiência cardíaca, caracterizados por diminuição da fração de ejeção do ventrículo esquerdo, apresentaram níveis séricos mais elevados (RIBEIRO et al, 2002). Os autores demonstraram altos níveis de BNP associados com depressão da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE) e com aumento do diâmetro final do VE, encontrando níveis de BNP duas vezes maior em pacientes com fração de ejeção inferior a 40% e níveis normais em pacientes com fração de ejeção superior a 40%. Os mesmos autores demonstraram também que pacientes com doença de Chagas com níveis plasmáticos de BNP

dentro dos valores de referência tinham baixos indícios de envolvimento cardíaco importante, dispensando a realização do ecocardiograma, mostrando ser um método útil para *screening* de pacientes com Doença de Chagas (2002). Em outro trabalho, Ribeiro e colaboradores demonstraram altos níveis de BNP associados com redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (VE), com aumento do diâmetro final do VE e número aumentado de complexos ventriculares prematuros em 24 horas, encontrando níveis de BNP quatro vezes maiores em pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica severa e fração de ejeção inferior a 40% e níveis normais em pacientes com fração de ejeção superior a 40% (2004). Outro achado foi o encontro de altas concentrações do BNP em pacientes com aneurisma apical associado à arritmia ventricular complexa, demonstrando então um valor prognóstico em pacientes com quadros mais complicados. Em relatos anteriores, a utilização do BNP em pacientes chagásicos sem disfunção ventricular não evidenciou níveis séricos diferentes da população normal (RIBEIRO et al, 2004). Estudos recentes indicaram que elevações nas concentrações séricas de BNP estão associadas à fibrose cardíaca (HERINGER-WALTER et al, 2003). Nesses mesmos estudos, esses autores avaliaram tanto o BNP e o ANP (peptídeo natriurético atrial) em pacientes com doença de Chagas em diferentes classes NYHA e demonstraram que ambos poderiam funcionar como bom marcador de prognóstico, sobressaindo-se o BNP. Concluíram que poderia ser usado como marcador naqueles pacientes doentes assintomáticos, ou seja, sem insuficiência cardíaca, tornando-o, então, um excelente marcador precoce de *screening* para disfunção ventricular (2003). Ribeiro e colaboradores, após estudo de comparação, demonstraram que a estratégia de dosar o BNP em

pacientes com ECG alterado é melhor do que aquela que realiza ECG e Rx de tórax de todos os pacientes para *screening* e detecção da disfunção ventricular esquerda precoce (RIBEIRO et al, 2006). Melo e colaboradores encontraram diferença estatisticamente significativa dos níveis séricos do BNP em pacientes crônicos com insuficiência cardíaca, mesmo sem dilatação de câmaras, quando comparados com pacientes apenas sorologicamente positivos. Concluíram, então, que o BNP poderia ser útil não só na avaliação da gravidade da doença de Chagas em indivíduos com insuficiência cardíaca congestiva, mas também naqueles com as formas incipientes da doença (MELO et al, 2005).

Barbosa e colaboradores estudaram o NT-proBNP como marcador de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, pois essa última tem sido implicada como agravador do prognóstico em pacientes com cardiopatia dilatada. Os níveis plasmáticos de NT-proBNP nesse estudo foram significativamente elevados em pacientes classificados nas classes III e IV da NYHA, mostrando uma correlação inversa significativa. Mostraram também uma forte correlação com a fração de ejeção do ventrículo esquerdo e uma fraca correlação com muitos dos parâmetros Doppler ecocardiográficos da função diastólica. Os níveis de NT-proBNP aumentaram com a deterioração da função diastólica, com níveis significativamente mais altos em pacientes com o padrão de enchimento restritivo, alcançando uma sensibilidade de 90%, especificidade de 70%, um valor preditivo positivo de 40,9% e um valor preditivo negativo de 96,9% para detectar esse padrão, quando comparados a outros padrões de função diastólica (BARBOSA et al, 2006).

2.5 – Estabilidade dos peptídeos natriuréticos

Há ainda controvérsia sobre a estabilidade do BNP e de outros peptídeos natriuréticos no sangue total. O BNP e, particularmente a fração inativa, o NT-proBNP são razoavelmente estáveis, tendo o BNP uma meia-vida de 23 minutos (LATINI et al, 2002). Já o NT-proBNP tem uma meia-vida de 120 minutos, o que explica o fato de os valores séricos do metabólito ser seis vezes mais altos que os do BNP, mesmo sendo as moléculas liberadas em proporções equimolares (WEBER et HAMM, 2006).

No ambiente *ex-vivo*, alguns autores afirmam que o BNP é estável em sangue total à temperatura ambiente com adição de EDTA por pelo menos 24 horas (WEBER et HAMM, 2006) ou por até 2-3 dias (BUCKEY et al, 1999). Entretanto, outros estudos demonstraram que os níveis do BNP são estáveis no sangue total por mais de 3 dias (LATINI et al, 2002).

Em relação ao NT-proBNP, alguns autores relatam que é estável por pelo menos 72 horas, em sangue total, sem necessidade de aditivos (WEBER et HAMM, 2006). Por ser uma molécula maior, o NT-proBNP tem uma meia-vida plasmática mais longa e, conseqüentemente, níveis mais elevados na circulação, o que facilita sua dosagem do ponto de vista analítico (JANUZZI et al. 2005; WEBER et HAMM, 2006).

Dentre os estudos que avaliaram a estabilidade dos peptídeos natriuréticos, alguns merecem destaque. Buckley e colaboradores, em 1999, demonstraram que eles são estáveis, em sangue total, por 2-3 dias à temperatura ambiente, e concluíram que as amostras poderiam ser enviadas por correio e

posteriormente separadas e congeladas. Demonstraram também não haver melhoria com o acréscimo de inibidor de proteases (aprotinina) na estabilidade dos peptídeos BNP e NT-ANP. Já Tsuji e colaboradores (1994) demonstraram que a degradação do BNP é menor com o acréscimo da aprotinina e que o congelamento do plasma mantém a estabilidade desse peptídeo. Muller e colaboradores (2004) estudaram a estabilidade do BNP e NT-proBNP em amostras congeladas a -20° Celcius sem adição de inibidor de proteases e concluíram que o BNP não se mantém estável em amostras congeladas após 4 meses, enquanto que o NT-proBNP poderia ser armazenado nas mesmas condições de tempo e temperatura sem perda relevante da imunorreatividade .

Outro trabalho que levanta também a questão da estabilidade em diferentes formas de armazenamento é o de Wu e colaboradores (2004) que estudaram, não só a influência da estocagem, em diferentes temperaturas, na recuperação da imunorreatividade, como também o desempenho de outro ensaio automatizado, o da Bayer ADVIA Centaur. Nesse trabalho, foram estudados pacientes normais e com insuficiência cardíaca de hospitais de vários estados norte-americanos, divididos em três grupos: o primeiro com 983 indivíduos normais, o segundo com 538 pacientes com algum tipo de doença crônica e o grupo 3 consistia de 722 pacientes com insuficiência cardíaca classificados nas 4 classes funcionais da NYHA. Para o estudo de estabilidade, amostras de 15 pacientes com insuficiência cardíaca foram colhidas em tubos contendo EDTA no tempo zero. O primeiro tubo foi mantido não centrifugado (sangue total) por 24 horas à temperatura de 22° Celcius. Nos tempos zero, 24 e 48 horas, uma alíquota do sangue total foi removida para um tubo plástico de microcentrífuga e centrifugada para obtenção de plasma. Esse plasma, então, foi aliquotado e

congelado a -70° Celcius para posterior determinação dos níveis de BNP. Outras alíquotas foram obtidas a partir do tubo contendo sangue total, sendo retiradas nos mesmos tempos e mantidas tanto a 22° Celcius, quanto a 4° Celcius. Os resultados que os autores obtiveram no estudo da estabilidade usando sangue total indicaram que o sangue poderia ser mantido à temperatura ambiente, sem ser processado por tempo superior a 24 horas, se necessário, antes da centrifugação, pois a média de recuperação do BNP após 24 horas foi 96% do valor medido no tempo zero e 80% após 48 horas. Em plasma mantido a 4° Celcius por mais 24 horas, a recuperação média foi de 91% do valor obtido na amostra processada imediatamente.

A recomendação da National Academy of Clinical Biochemistry (NACB) e International Federation of Clinical Chemistry Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage (IFCC C SMCD) em 2005 (2005) para os fabricantes e laboratórios usuários dos ensaios dos peptídeos natriuréticos e seus metabólitos foi que estabelecessem especificações analíticas e pré-analíticas de qualidade antes da introdução na prática clínica. Um dos critérios pré-analíticos é a determinação do efeito do armazenamento e temperatura sobre o resultado do ensaio (APPLE et al, 2007).

2.6 – Precisão dos ensaios

O sistema de cuidado à saúde tem sido definido como um conjunto de partes ou agentes independentes ou conectados, incluindo profissionais e pacientes, ligados por um propósito e ações comuns no seu conhecimento.

O laboratório médico, um componente vital do sistema de cuidado à saúde, desempenha um papel essencial no diagnóstico clínico, manejo e tomada de decisões para o paciente. Entretanto, o tradicional papel dos laboratórios clínicos está sob nova ótica crítica, em particular pelos limites ou fronteiras entre a produção/utilização dos dados laboratoriais (PLEBANI et SIEST, 2006).

Considera-se que resultado laboratorial final emitido seja o conjunto do valor obtido no ensaio, acrescido do erro aleatório e do viés analítico.

O erro aleatório é o erro decorrente da imprecisão metodológica e é estimado com base no desvio padrão expresso na unidade de medida do analito, ou em termos de coeficiente de variação (BASQUES, 2006).

O viés analítico (inexatidão ou erro sistemático) é definido como a diferença entre a média dos resultados encontrados nas medições em replicata e o valor verdadeiro ou valor de referência da concentração medida (BASQUES, 2006).

Esse conjunto é chamado genericamente de erro total, que é estimado como a soma dos efeitos do erro aleatório e do viés analítico (BASQUES, 2006).

Os princípios e o planejamento do sistema da qualidade requerem o uso do erro total porque é o erro inserido em um resultado de laboratório (BASQUES, 2006).

Na realidade, as informações atuais são insuficientes para quantificação exata do impacto que os erros laboratoriais (imprecisão, viés etc.) provocam atualmente no resultado e cuidado clínico, mesmo considerando o aumento de evidências apoiando a relevância das fases pré e pós analíticas na produção de erros na prática laboratorial (PLEBANI et SIEST, 2006).

Alguns fatores, pré-analíticos e analíticos, já foram relacionados como sendo impactantes na imprecisão dos resultados dos testes, aumentando o erro total e estão intrinsicamente incluídos nas especificações de qualidade (APPLE et al, 2007).

As especificações de qualidade têm sido definidas como “o nível de desempenho requerido para auxiliar nas tomadas de decisões clínicas”, não estando limitadas ao manejo de boas práticas internas laboratoriais através de controle estatístico de qualidade interno efetivo e programas de proficiência (PLEBANI et SIEST, 2006).

Plebani e Siest, em editorial (2006), recomendam que as especificações de qualidade devam seguir alguns critérios que são: ser completamente baseados em necessidades médicas, usáveis em qualquer tipo de laboratório, ser de modelos facilmente compreensíveis e ser universalmente aceitos por todos os profissionais usuários. No mesmo editorial, sugerem, então, que as especificações de qualidade baseadas na variação biológica seriam aquelas que melhor atendem a esses critérios e recomendam que o desempenho analítico dos testes deveria se basear nessas especificações (PLEBANI et SIEST, 2006). Basques acrescenta uma outra consideração de que essas especificações de qualidade estão construídas, valendo-se de modelos simples, facilmente compreensíveis e amplamente aceitos por profissionais da saúde, em razão da coerência (BASQUES, 2006). Define-se variação biológica intra-individual (VB_i) ou inerente como a que ocorre em torno do ponto homeostático do indivíduo, sendo Fraser considerado um dos mentores desta teoria da variação biológica (FRASER, 2001). É a que ocorre quando removemos o efeito da variação analítica através do controle interno da

qualidade, e aí permanece uma diferença entre os resultados do mesmo indivíduo (BASQUES, 2006). Define-se variação biológica interindividual ou intragrupo (CV_g) aquela obtida após aplicarmos o mesmo procedimento em vários indivíduos e quando observarmos que a variabilidade da concentração dos analitos será diferente entre si (BASQUES, 2006).

As recomendações de qualidade baseadas na variação biológica foram largamente aceitas nos laboratórios médicos e são agora reconhecidas como tendo um importante papel nos modelos hierárquicos estabelecidos nas conferências organizadas em Estocolmo em abril de 1999 pela International Federation of Clinical Chemistry (IFCC), Organização Mundial de Saúde (OMS) e International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) (FRASER, 2001; 2005).

O modelo original, concebido por Cotlove e colaboradores, é baseado no conceito de que imprecisão analítica e o viés não deveriam afetar significativamente o resultado clínico. De acordo com esse modelo, o impacto clínico mínimo desejável pode ser obtido quando o coeficiente de variação analítico total (CV_T) ou a imprecisão analítica é inferior à metade do valor da variação biológica intra-individual (VB_i) (COTLOVE et al, 1970).

A partir das conferências, foram publicados vários painéis contendo informações sobre variação biológica dos analitos quantificáveis e o impacto sobre seus valores de referência.

Modelos muito bem documentados e publicados sugerem que, nas aplicações clínicas de diagnóstico e monitorização, devam-se usar as especificações de qualidade (imprecisão e viés) derivadas dos componentes da variação

biológica que são a variação biológica intra-individual (VB_i) e interindividual ou intragrupo (CV_G) (BASQUES, 2006).

Assim como em outros analitos, estudos foram desenvolvidos para determinar o impacto da variação biológica sobre as metodologias disponíveis para detecção dos peptídeos natriuréticos, de modo a alcançar critérios objetivos para interpretação dos resultados.

Apple e colaboradores, em nome do Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage do IFCC, após revisão da literatura que mostrou grande variação biológica do BNP (VB_i de aproximadamente 30-50%), sugeriram que um CV_T muito baixo seria desnecessário e recomendaram CV_T inferior a 15% em concentrações do BNP dentro do intervalo de referência (APPLE et al, 2005).

Fraser tem criticado essas recomendações, preconizando que a teoria da variação biológica não seria totalmente apropriada para os peptídeos natriuréticos (FRASER, 2005).

Um trabalho em especial, de Aldo Clerico e colaboradores, ganha destaque, pois parece desafiar a validade do modelo de variação biológica para os peptídeos natriuréticos. Nesse trabalho, os autores reforçam Fraser quando afirmam:

a) que o BNP, como muitos hormônios, tem um VB_i muito amplo e suas variações nos líquidos biológicos (plasma, soro) dependem restritamente da ativação de um sistema regulatório, tornando a teoria da variação randômica em volta de um ponto homeostático inapropriada.

b) que os modelos estatísticos usados em muitos estudos que calcularam o VB_i com grande amplitude eram inadequados e, portanto, tal achado não seria fidedigno.

c) que os ensaios automatizados comerciais disponíveis apresentam um CV menor que os 15% preconizado, alguns relatando valores inferiores a 5%. Desta forma, torna-se arriscado aceitar grandes valores de VB_i , o que poderia influenciar os fabricantes a não almejarem produtos com melhor desempenho.

d) Algumas evidências já demonstraram que uma diminuição dos níveis de BNP de aproximadamente 30% depois da instituição do tratamento está associada com melhora clínica. Isso reforça a necessidade de conhecermos o desempenho analítico em decisões clínicas específicas, que conforme mencionado por Basques (2006), esse modelo é o de mais elevada posição na hierarquia e o de maior mérito, porque as especificações de qualidade derivadas de estudos clínicos refletem melhor as necessidades médicas atuais.

e) Considerando o NT-proBNP, há amplas diferenças entre os poucos estudos descritos na literatura, tornando obrigatórias novas pesquisas (CLERICO et al, 2006).

Desta forma, constata-se que não há consenso sobre as adequadas especificações de qualidade baseadas na variação biológica ou um modelo que seja alternativo e satisfatório para os ensaios de determinação de BNP e NT-proBNP. Plebani et Siest recomendam a realização de outros estudos para melhor compreensão da verdadeira variação biológica intra-individual do BNP e NT-proBNP (2006).

Percebe-se a necessidade premente de se estabelecer modelos de especificações de qualidade para avaliação dos ensaios dos peptídeos natriuréticos disponíveis atualmente (PLEBIANI, 2006).

Para os peptídeos natriuréticos, isso se torna crítico, uma vez que vários trabalhos já demonstraram seu valor prognóstico e como avaliador da eficácia do tratamento instituído (MAISEL, 2003; LATINI et al, 2002). Para monitoração do sucesso de tratamento, são necessárias análises seriadas, nas quais a variação biológica e a imprecisão analítica podem refletir em mudanças significativas dos resultados (WU, 2006). Esse autor revisou a literatura em busca de evidências que assegurassem a determinação da variabilidade biológica e valores significativos de mudança entre as dosagens que pudessem então tornar aplicável o uso das medidas seriadas para guiar o tratamento para a insuficiência cardíaca. Constatou que a maior parte dos estudos foi conduzida em indivíduos saudáveis, com algumas exceções que pesquisaram em pacientes com insuficiência cardíaca, porém estáveis. Detectou que os maiores CV_T pertenciam a ensaios manuais (Shionogi ShionoRIA), seguidos dos remotos (Biosite Triage, Biosite, San Diego, CA) e por último, os ensaios automatizados (Roche Elecsys e Abbott AxSYM). Além disso, relata que a variação do CV_I , semana a semana para o BNP e NT-proBNP, é relativamente alta, de 33 a 60%, comparados a outros analitos clínicos, como por exemplo, os eletrólitos. Em decorrência da elevada variação analítica e biológica, o autor recomenda a utilização do cálculo da diferença crítica entre resultados ou *reference change value* (RCV), quando utilizamos tais ensaios com a finalidade de monitoração. O RCV representaria o percentual mínimo significativo que indica declínio em relação às concentrações basais do BNP e NT-proBNP,

após o início do tratamento (FRASER, 2001; WU, 2006) e é estimado a partir da variação analítica (do próprio laboratório) e da variação biológica intra-individual tomada de banco de dados. Esse modelo foi desenvolvido por Harris e Yasaka (HARRIS et YASAKA, 1983) e seus cálculos foram divulgados por Omar, van der Watt e Pillay (2008). Para sugerir progressão clínica da doença, o valor de RCV deveria ser multiplicado por dois (2) em relação aos valores iniciais de BNP e NT-proBNP para se obter a mudança necessária (WU, 2006).

O autor ainda relata que os RCVs dos ensaios de BNP foram maiores que os do NT-proBNP e que isso sugere que este último seja um marcador mais sensível para detectar mudanças estatisticamente significativas em determinações seriadas. Este achado pode estar relacionado à meia-vida do NT-proBNP mais longa e ao fato de não existir metabolização deste pelas neuropeptidases como o que ocorre com o BNP. O maior mecanismo de eliminação do fragmento NT-proBNP é por excreção renal, sendo encontradas grandes concentrações do NT-proBNP na urina. O QUADRO 2 resume os achados de Wu.

QUADRO 2

Resumo dos estudos de variação biológica – Wu, 2006

	CV_T	CV_I	RCV
BNP em indivíduos normais			
Biosite	8.6	44	61%
ShinoRIA	16.7	59	84%
Bayer Centauro	1.8	50	69%
NT-proBNP em indivíduos saudáveis			
Elecsys (Roche) - Semana a semana	1.6	33	46%
Elecsys (Roche) - Semana a semana	4.0	35	49%
Elecsys (Roche) - Dia a dia	2.7	9.1	26%
BNP em pacientes estáveis com IC			
Biosite Triage intra-dia	8.6	24	38%
Abbott AxSYM intra-dia	8.4	8.2	16%
Abbott AxSYM Dia a dia	8.4	25	37%
Abbott AxSYM Semana a semana	8.4	41	56%
Biosite Triage intra-dia	13.7	5.0	20%
Biosite Triage dia a dia	13.7	25	39%
NT-proBNP em cardiopatas estáveis			
Elecsys (Roche) Intra-dia	3.0	8.6	12%
Elecsys (Roche) Dia a dia	3.0	20	27%
Elecsys (Roche) Semana a semana	3.0	35	40%
Elecsys (Roche) Intra-dia	2.8	6.3	10%
Elecsys (Roche) Dia a dia	2.8	21	29%
Média dos resultados combinados de indivíduos saudáveis e cardiopatas estáveis			
BNP intra dia			25%
BNP dia a dia			38%
BNP semana a semana			71%
NT-proBNP intra dia			11%
NT-proBNP dia a dia			27%
NT-proBNP semana a semana			47%

Outra questão importante é considerar a variabilidade interindividual (CVg) no sistema BNP. Alguns estudos têm tentado estabelecer relação do polimorfismo genético do receptor humano tipo A, que é o responsável pela ligação do BNP e ANP, e sua contribuição para a variabilidade interindividual (CVg) no sistema do BNP (WEBER et al, 2008). Os autores comentam que a variação inerente nos genes que codificam o receptor ligador pode ser um importante determinante na variabilidade da atividade ligadora e influenciar seus efeitos biológicos. Relatam também que em modelos animais, já foram demonstrados que mudanças quantitativas na expressão do gene NPR-1 que codifica o receptor NPR-A têm efeitos significativos na pressão arterial e na massa cardíaca. Relataram também que já foi demonstrado que indivíduos japoneses geneticamente deficientes nos receptores NPR-A podem exibir níveis mais altos de BNP quando comparados a indivíduos com receptores tipo selvagens.

Os autores comentam que três haplotipos nas regiões 3' e 5' do gene que codifica o receptor já foram identificadas. Três delas, incluindo CT6, 3-plus e 4-minus têm sido relacionados a efeitos quantitativos na expressão do receptor in vitro. Quando os autores estudaram esse efeito in vivo, encontraram que o haplotipo 4-minus, identificado na região não traduzida 3' do gene do receptor NPR-A, é associado com níveis significativamente mais altos de NT-proBNP, realizados pelo ensaio Roche Elecsys, quando comparados às outras variantes genéticas. Supõe-se que o mecanismo responsável por esse efeito seria a instabilidade do RNA mensageiro levando à diminuição da tradução do gene.

Quando, em estudo, detectaram-se níveis mais aumentados do NT-proBNP em indivíduos geneticamente deficientes no receptor NPR-A, devido à presença do haplotipo 4-minus, especulou-se que essa associação seria resultante da regulação negativa de feed-back, onde a função diminuída do sistema BNP provocada pelo defeito genético no receptor, conseqüentemente levaria a uma regulação positiva da expressão do gene do BNP, no sentido de compensar essa deficiência. Um mecanismo similar de autoregulação já foi descrito para o ANP. Como o observado nesse estudo só foi estatisticamente significativo no grupo controle e não no de pacientes doentes (insuficiência cardíaca com fração de ejeção inferior a 50% e pacientes com síndrome coronariana com alterações no eletrocardiograma), eles concluíram que o impacto do defeito do receptor NPR-A na regulação do BNP nesses pacientes seria difícil de se detectar, sugerindo que o polimorfismo descrito não teria efeito na variação interindividual nos valores de BNP e NT-proBNP sob condições patológicas. Porém, eles acreditam que a relação entre o haplotipo 4-minus e altos níveis de NT-proBNP trarão novos rumos para as aplicações diagnósticas e terapêuticas dos peptídeos natriuréticos. Por não se relacionarem com sexo e idade, como ocorre com o BNP e NT-proBNP, o haplotipo 4-minus seria um preditor independente dos altos níveis de NT-proBNP e um outro campo de estudo seria avaliar se ele seria mais frequente em indivíduos não responsivos ao tratamento, e se esse fato seria o responsável pela falha à terapêutica que esses indivíduos apresentam (WEBER et al, 2008)

Diante, então, das controvérsias que ainda existem quanto à estabilidade dos analitos, BNP e NT-proBNP, e quanto ao desempenho de métodos automatizados frequentemente empregados em laboratórios clínicos,

propusemos executar este estudo com o objetivo de avaliar a estabilidade a partir de amostras frescas e suas alíquotas refrigeradas e congeladas e, ainda, avaliar a precisão dos ensaios, através da determinação dos valores de coeficientes de variação para os dois ensaios, em um espaço de atuação de um laboratório clínico.

2.7 – Hipóteses

- Resultados de precisão obtidos pelo fabricante em situações padronizadas podem não ser reprodutíveis em laboratórios clínicos.
- Diferentes formas de armazenamento podem interferir na estabilidade do peptídeo natriurético cerebral e da fração amino terminal proBNP e, portanto comprometer o resultado de amostras não frescas.

3 – Objetivos

3.1 – Objetivo geral:

- Analisar o desempenho de métodos automatizados de BNP e NT-proBNP, compará-los e conhecer a estabilidade de peptídeos natriuréticos.

3.2 – Objetivos específicos:

- Estabelecer estudos de precisão através da determinação dos coeficientes de variação intra-ensaio (CV_I) e total (CV_T) para o imunoensaio enzimático de micropartículas do BNP e para o imunoensaio enzimático quimioluminescente do NT-proBNP.

- Comparar o desempenho dos dois ensaios.

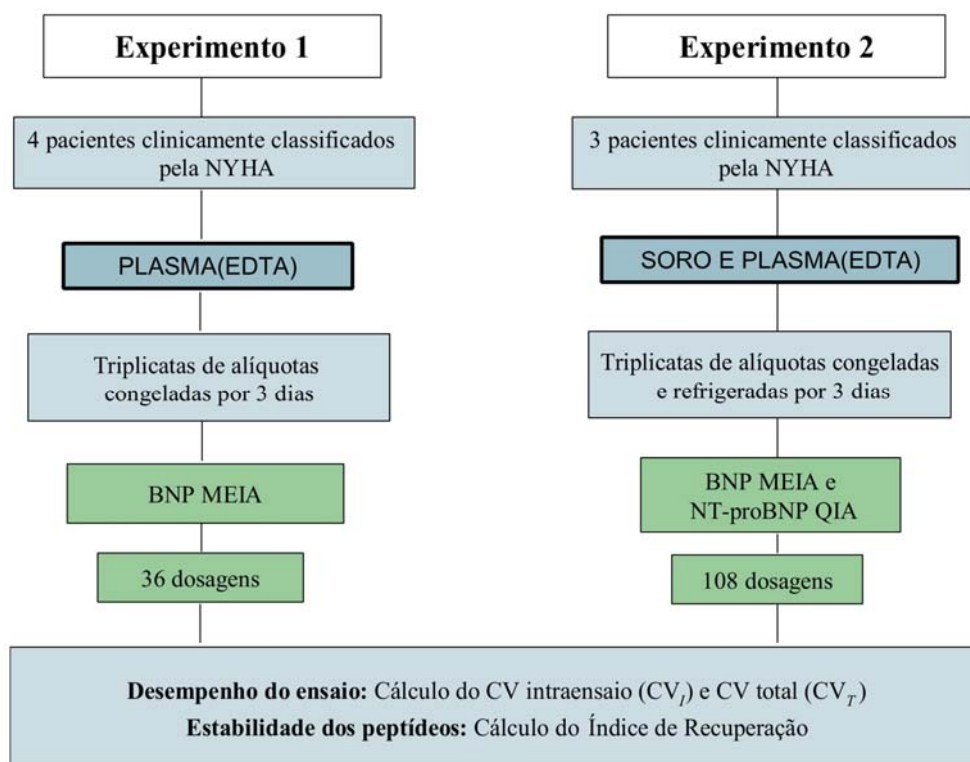
- Avaliar a estabilidade do BNP e do NT-proBNP em metodologias automatizadas a partir de amostras frescas, suas alíquotas refrigeradas e congeladas, através da determinação do percentual de recuperação.

4 – Material e Métodos

4.1 – Delineamento experimental

As análises realizadas neste estudo foram desenvolvidas em duas etapas diferentes, que denominaremos Experimento 1 e Experimento 2. No primeiro, foi avaliado o ensaio BNP MEIA, utilizando-se amostras divididas em alíquotas congeladas, e no segundo, mais completo, foram avaliados os ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA, utilizando-se amostras divididas em alíquotas congeladas e refrigeradas. Em ambas as ocasiões, foram realizados estudos de estabilidade e de precisão ou desempenho do ensaio, conforme fluxograma abaixo (Figura 4).

Figura 4



4.2 – Amostras

Os pacientes clinicamente classificados segundo a NYHA classes I a IV foram selecionados a partir de clínica cardiológica, ambulatorial e hospitalar.

As amostras de sangue foram colhidas por punção venosa padrão em tubos de plástico contendo EDTA (Vacurette) para plasma (BNP) e tubos sem anticoagulante para obtenção de soro (NT-proBNP). Após a formação de coágulo de fibrina visível nos tubos sem anticoagulante, as amostras foram centrifugadas a 3500 gramas por 10 minutos, juntamente com as de EDTA. Após essa etapa, ainda no dia 1, as amostras de plasma e soro obtidas foram separadas e aliquotadas devidamente identificadas ainda dentro de 4 horas após a coleta, para posterior armazenamento (refrigeração entre 2 e 8° Celcius ou congelamento a -20° Celcius).

4.3 – Estudos de estabilidade e precisão

O estudo de estabilidade foi realizado ensaiando as alíquotas, em triplicata, durante 3 dias consecutivos. No primeiro dia, as alíquotas foram processadas ainda dentro de 4 horas após a colheita (frescas), e no segundo e terceiro dias as alíquotas usadas estavam armazenadas congeladas ou refrigeradas, mas só foram processadas após terem atingido a temperatura ambiente espontaneamente. O estudo de estabilidade consistiu em comparar os resultados das médias do segundo e terceiro dias com as do primeiro dia e calcular o percentual de recuperação da imunorreatividade para cada média.

A precisão dos dois métodos foi avaliada considerando o protocolo modificado do documento EP15-A do NCCLS usando amostras de plasma de EDTA de 4 pacientes classificados segundo a NYHA classes I a IV na primeira fase (BNP) e amostras de plasma e soro de 3 pacientes classificados I, II e IV segundo a NYHA, na segunda fase (BNP e NT-proBNP). O documento EP15-A do NCCLS recomenda o estudo de precisão em cinco dias consecutivos e no estudo em questão, usamos um protocolo menor, utilizado em laboratórios clínicos.

Para avaliação da precisão foram calculados os CV intraensaio (CV_i) e CV total (CV_T) das amostras refrigeradas e congeladas.

O estudo de avaliação da precisão do BNP foi realizado duas vezes (experimentos 1 e 2) e o do NT-proBNP uma vez (experimento 2) perfazendo um total de 144 dosagens.

4.4 – Ensaio

As alíquotas devidamente identificadas quanto a sua forma de armazenamento foram posteriormente analisadas através de ensaios completamente automatizados.

O ensaio de BNP foi realizado no equipamento AxSYM Abbott alocado no Biocor Instituto Hospital de Doenças Cardiovasculares e o ensaio de NT-proBNP foi realizado no equipamento Elecsys Roche alocado no Laboratório Labrede.

Para a dosagem de BNP, foi utilizado ensaio AxSYM (Laboratórios Abbott, IL, USA), imunoensaio enzimático de micropartículas (MEIA), utilizando dois anticorpos monoclonais de rato num formato sanduíche de duas etapas.

Resumidamente, micropartículas revestidas com anticorpo monoclonal de camundongo anti-BNP são incubadas com plasma colhido em EDTA na presença de tampão TRIS. Posteriormente, essa mistura é transferida à célula matriz para possibilitar a ligação irreversível das micropartículas à matriz de fibra de vidro. Após lavagem, conjugado anti-BNP marcado com fosfatase alcalina é adicionado, seguindo-se da adição de 4-metilumbeliferil fosfato (MUP). O produto é medido por sistema ótico, automatizado.

O segundo ensaio, o NT-proBNP, um ensaio Elecsys (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha) é também um imunoensaio enzimático não competitivo tipo sanduíche de duas etapas (QIA), que incorpora um primeiro anticorpo específico policlonal biotilado, um segundo marcado com complexo de rutênio e micropartículas recobertas com estreptavidina, usando tecnologia eletroquimioluminescente para leitura final.

No ensaio do NT-proBNP, anticorpos policlonais específicos anti-NT-proBNP com e sem complexo de rutênio reagem com o antígeno da amostra, formando um complexo sanduíche. Posteriormente, essa mistura se liga às micropartículas revestidas de estreptavidina e todo esse complexo se liga à fase sólida pela interação da biotina e estreptavidina. Após aspiração de todo o complexo para a célula de leitura, micropartículas são fixadas magneticamente à superfície do eletrodo e após lavagem, aplica-se uma corrente elétrica ao eletrodo que induz uma emissão quimioluminescente que é medida por um fotomultiplicador.

4.5 – Análise estatística

Para determinação da recuperação da amostra após refrigeração ou congelamento, consideramos o resultado do dia 1 ou alíquota fresca como 100% e obtivemos a porcentagem através da razão abaixo:

$$\text{valor do dia 1} / \text{valor médio do dia ensaiado} \times 100$$

Para determinação dos CV intraensaio (CV_I) e total (CV_T), seguiu-se a recomendação do protocolo modificado EP15-A do NCCLS e os cálculos foram realizados utilizando o programa QualiChart^R versão 2.7.3d.

Para comparação das médias dos valores individuais das triplicatas e dos CV_I e CV_T , foram empregados os testes ANOVA ou Welch, dependendo da distribuição da amostra segundo teste de Levene. Amostras com distribuição normal foram testadas pelo ANOVA e aquelas sem distribuição normal, foram testadas pelo Welch.

Nessas duas etapas utilizou-se o programa SPSS^R versão 14.0. Foram considerados como significantes valores de p inferiores a 0.05.

4.6 – Considerações éticas

Esse projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa ETIC N° 0174/07 da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG e do Biocor Instituto Hospital de Doenças Cardiovasculares, BH, MG.

5 – Resultados

Os dados obtidos neste estudo serão mostrados em duas partes. A primeira abordará os estudos de precisão dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA, através da definição dos respectivos valores de CV_I e de CV_T .

Na segunda, serão mostrados os dados relativos aos estudos de avaliação da estabilidade dos analitos, BNP e NT-proBNP, por 3 dias, em condições de congelamento ou refrigeração, considerando os dois ensaios, BNP MEIA e NT-proBNP QIA.

ESTUDOS DE PRECISÃO

5.1 – Determinação dos coeficientes de variação intraensaio (CV_I) e total (CV_T) do imunoensaioenzimático de micropartículas BNP MEIA® (Abbott)

Para o estudo da precisão analítica dos ensaios, optou-se pela determinação dos valores de CV_I e CV_T .

Para o primeiro conjunto de testes (Experimento 1), realizou-se avaliação inicial de análises seriadas de quatro diferentes amostras que se encontravam próximas aos valores médios esperados em cada classe funcional, de acordo com a classificação da NYHA, em três dias consecutivos, em triplicata de alíquotas congeladas, como descrito em Material e Métodos.

Na Figura 5, estão mostradas as determinações dos valores individuais do ensaio BNP MEIA nas triplicatas, em três dias consecutivos, nas quatro classes funcionais avaliadas.

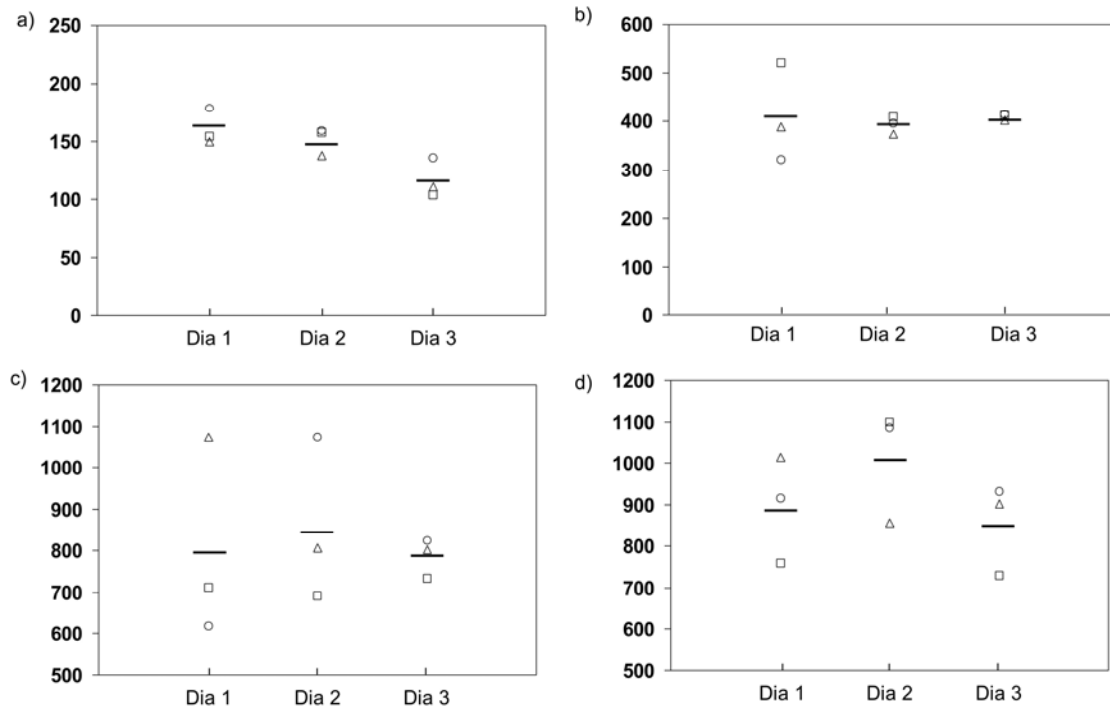


Figura 5: Experimento 1: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), Classe III (c) e Classe IV (d) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.

Os valores de CV_I encontrados foram de 10.78% na amostra de concentração média de 143.11 pg/mL (Classe I NYHA), 10.32% para a de concentração média de 404.0 pg/mL (Classe II NYHA), 19.67% para a de concentração média de 814.42 pg/mL (Classe III NYHA) e 13.6% para a de 921.52 pg/mL (Classe IV NYHA). Na avaliação da imprecisão total, os valores de CV_T foram 16.81%, 12.98%, 19.68% e 14.15%, respectivamente, para as diferentes classes (TABELA 1).

TABELA 1
Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I, II, III e IV do experimento 1
Alíquotas congeladas

Classe funcional	Média	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	CV_T
Classe I	143.11	9.77	7.82	14.77	10.78	16.81
Classe II	404.00	24.79	4.55	1.63	10.32	12.98
Classe III	814.42	30.04	22.90	6.08	19.67	19.68
Classe IV	921.43	14.48	13.41	12.92	13.60	14.15

Como, então, esses dados mostraram valores de CV superiores aos encontrados pelos fabricantes, decidiu-se pela repetição dos testes (Experimento 2). Nesta ocasião, utilizaram-se três amostras das Classes I, II e IV e avaliou-se também a influência das condições de armazenamento, empregando alíquotas congeladas e alíquotas refrigeradas. Decidiu-se não usar a Classe III no experimento 2, em função dessa classe ter apresentado a maior variação nos valores de CV_I e CV_T no experimento 1. A Figura 6 mostra os resultados dos valores individuais das alíquotas congeladas do experimento 2.

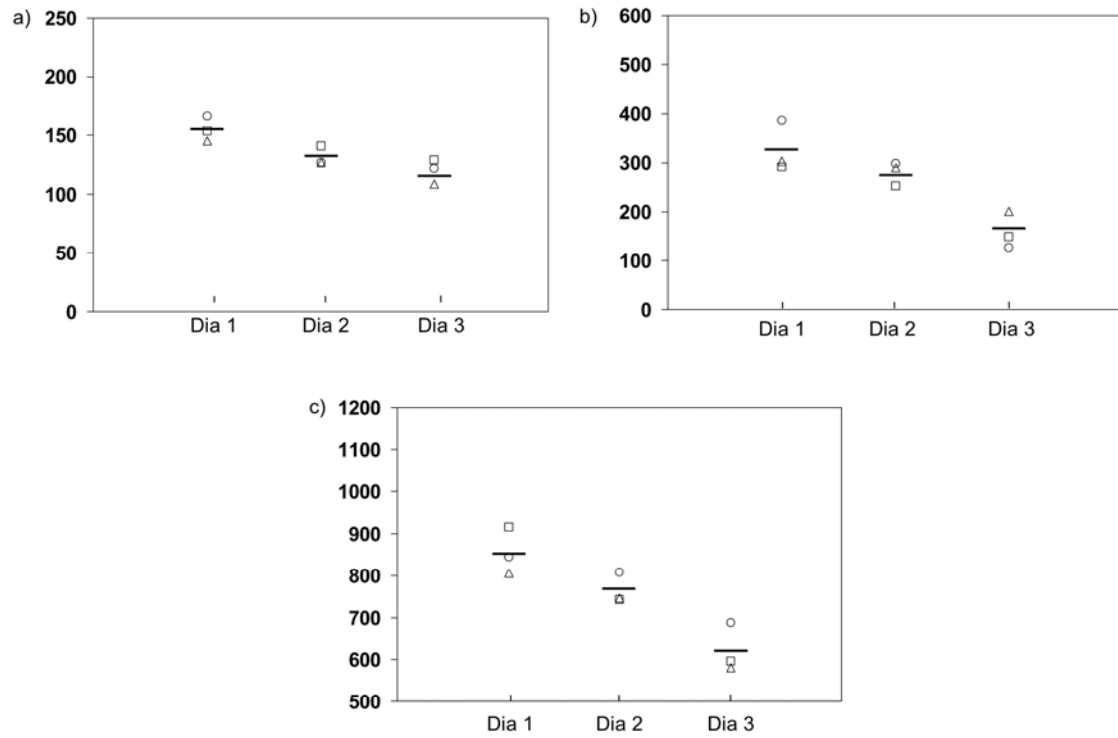


Figura 6: Experimento 2: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.

A Figura 7 mostra os resultados das alíquotas refrigeradas.

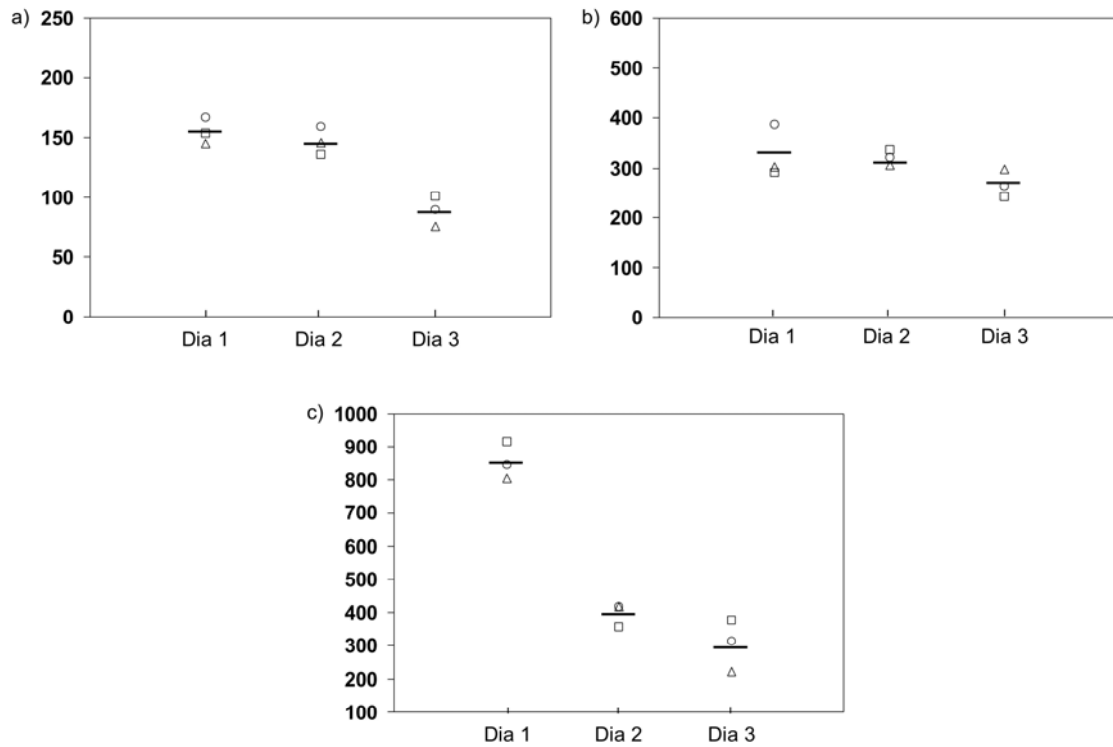


Figura 7: Experimento 2: Valores individuais de BNP de triplicatas de plasmas refrigerados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.

Os dados de precisão para BNP MEIA, neste segundo experimento, foram os seguintes: CV_I médio de 7.41% e CV_T de 13.22% numa concentração média de 135.31 pg/mL, CV_I médio de 16.28% e CV_T de 32.36% numa concentração média de 255.31 pg/mL, CV_I médio de 6.88% e CV_T de 14.87% numa concentração média de 747.5 pg/mL para as alíquotas congeladas (TABELA 2).

TABELA 2
Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I, II e IV do experimento 2
Alíquotas congeladas

Classe funcional	Média	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	CV_T
Classe I	135.31	7.17	6.32	8.75	7.41	13.22
Classe II	255.31	16.01	8.58	24.25	16.28	32.36
Classe IV	747.50	6.54	4.80	9.32	6.89	14.87

Para as alíquotas refrigeradas, os resultados foram: CV_I médio de 9.78% e CV_T de 25.48% numa concentração média de 130.13 pg/mL, CV_I médio de 10.39% e CV_T de 13.75% numa concentração média de 305.00 pg/mL, CV_I médio de 13.67% e CV_T de 50.36% numa concentração média de 518.31 pg/mL (TABELA 3).

TABELA 3
Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio BNP MEIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I, II e IV do experimento 2
Alíquotas refrigeradas

Classe funcional	Média	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	CV_T
Classe I	130.13	7.17	7.80	14.39	9.78	25.48
Classe II	305.00	16.01	4.64	10.54	10.39	13.75
Classe IV	518.31	6.54	9.02	25.46	13.67	50.36

Os resultados da validação do BNP no nosso estudo, nas suas duas fases, demonstraram uma alta variação, tanto nas amostras refrigeradas quanto nas congeladas, com valores de CV_I e CV_T , superiores àqueles fornecidos pelo fabricante (Abbott Diagnóstica). Os coeficientes de variação da dosagem de BNP definidos pelos fabricantes são 4.3% a 6.3% para imprecisão intra-ensaio (CV_I) e 6.5% a 9.4% para imprecisão total (CV_T) (dado obtido na página eletrônica da FDA: www.fda.gov).

Com o objetivo de verificar a influência das condições de armazenamento na precisão do método, procedeu-se à comparação dos valores dos CV_i médios obtidos no ensaio do BNP MEIA, das triplicatas de alíquotas congeladas *versus* refrigeradas para amostras Classes I, II (ANOVA) e Classe IV (Welch) do experimento 2 (TABELA 4). Não foi observada diferença dos CV_i médios entre as diferentes formas de armazenamento.

TABELA 4
Comparação da variação dos CV_i médios do ensaio do BNP MEIA das triplicatas de alíquotas congeladas x refrigeradas

Armazenamento	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
Congelado	I	3	7.41	1.23	.71	4.35	10.47	6.32	8.75	.382
Refrigerado		3	9.78	3.99	2.30	-.14	19.72	7.17	14.39	
Total		6	8.60	2.94	1.20	5.50	11.69	6.32	14.39	
Congelado	II	3	16.28	7.83	4.52	-3.19	35.75	8.58	24.25	.352
Refrigerado		3	10.39	5.68	3.28	-3.72	24.52	4.64	16.01	
Total		6	13.33	6.92	2.82	6.07	20.60	4.64	24.25	
Congelado	IV	3	6.88	2.27	1.31	1.22	12.55	4.80	9.32	.372
Refrigerado		3	13.67	10.28	5.93	-11.22	39.21	6.54	25.46	
Total		6	10.28	7.62	3.11	2.27	18.28	4.80	25.46	

Classes I e II (ANOVA); Classe 4 (Welch)

5.2 – Determinação dos coeficientes de variação intraensaio (CV_i) e total (CV_T) do imunoensaioenzimático quimioluminescente NT-proBNP QIA[®] (Roche)

No Experimento 2, avaliou-se também a precisão do método de imunoensaioenzimático quimioluminescente para a determinação de NT-proBNP sérico.

Na Figura 8, estão mostrados os valores individuais de NT-proBNP nas triplicatas de alíquotas congeladas, em três dias consecutivos, nas três classes funcionais I, II e IV da NYHA avaliadas no experimento 2. A partir desses dados, foram obtidos os valores de CV_I e CV_T .

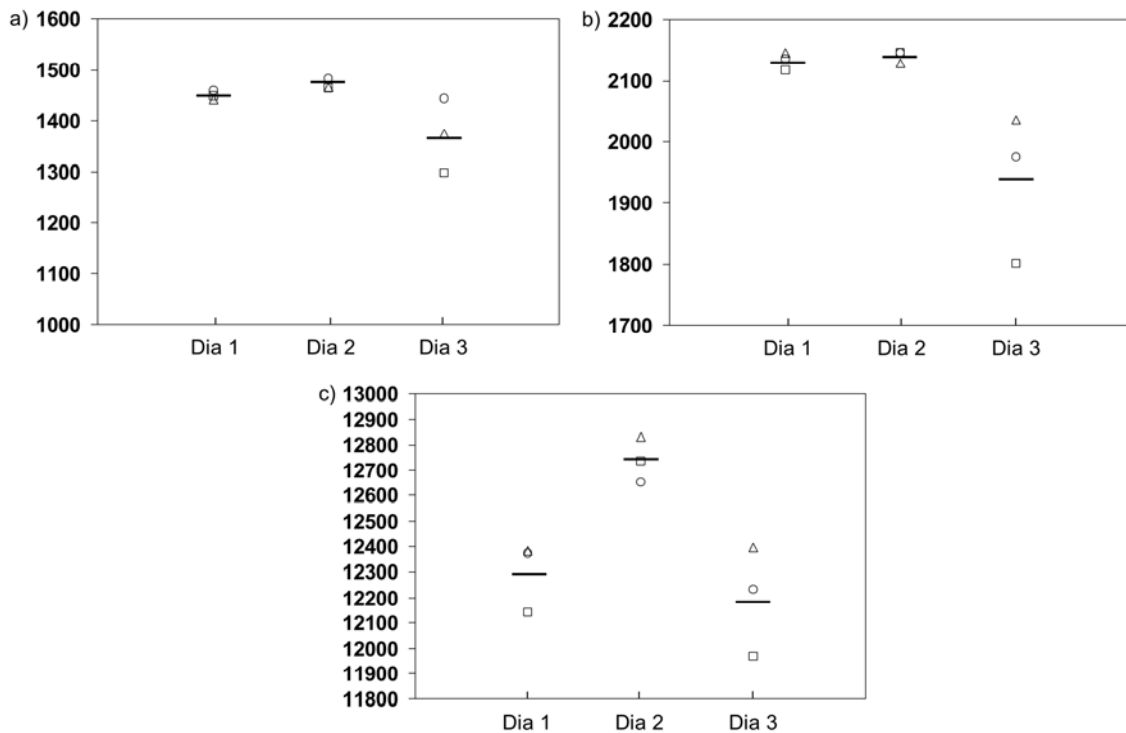


Figura 8: Experimento 2: Valores individuais de NT-proBNP de triplicatas de soros congelados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.

Os resultados da validação do experimento 2 para as alíquotas congeladas foram: CV_I médio de 2.22% e CV_T total de 4.08% numa concentração média de 1431.66 pmol/L (Classe I), CV_I médio de 2.47% e CV_T de 5.67% numa concentração média de 2070 pmol/L (Classe II), CV_I médio de 1.19% e CV_T de 2.28% numa concentração média de 12412 pmol/L (Classe IV) (TABELA 5).

TABELA 5
Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio NT-proBNP QIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I,II e IV do experimento 2
Alíquotas congeladas

Classe funcional	Média	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	CV_T
Classe I	1431.66	0.55	0.75	5.36	2.22	4.08
Classe II	2070.00	0.67	0.46	6.28	2.47	5.67
Classe IV	12412.00	1.11	0.70	1.77	1.19	2.28

A Figura 9 mostra as determinações do NT-proBNP em alíquotas refrigeradas.

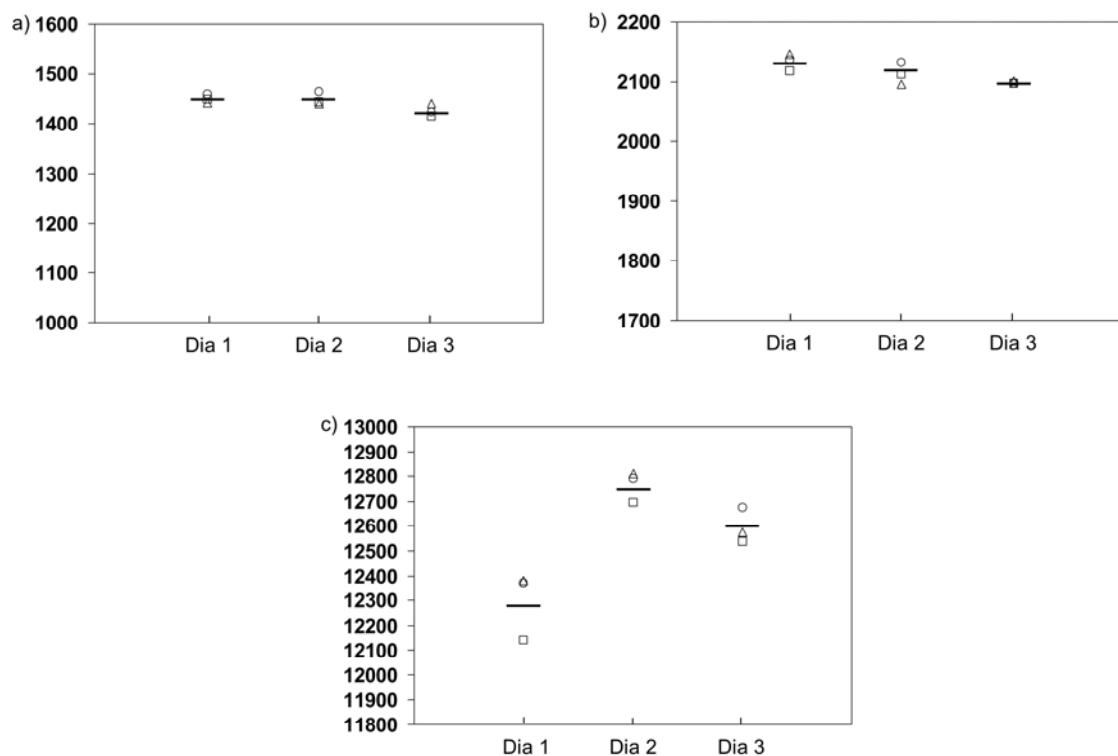


Figura 9: experimento 2: Valores individuais de NT-proBNP de triplicatas de soros refrigerados de pacientes portadores de insuficiência cardíaca Classe I (a), Classe II (b), e Classe IV (c) NYHA em 3 dias consecutivos. Barras transversais correspondem às médias.

Para as alíquotas refrigeradas, os resultados foram os seguintes: CV_I médio de 0.78% e CV_T de 1.07% numa concentração média de 1442.33 pmol/L, CV_I médio de 0.55% e CV_T de 0.9% numa concentração média de 2115.33 pmol/L,

CV_I médio de 0.72% e CV_T de 1.76% numa concentração média de 12553.44 pmol/L (TABELA 6).

TABELA 6
Valores de CV_I e CV_T das triplicatas do ensaio NT-proBNPQIA nos diferentes dias e nas classes funcionais I, II e IV do experimento 2
Alíquotas refrigeradas

Classe funcional	Média	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	CV_T
Classe I	1442.33	0.55	0.75	5.36	0.78	1.07
Classe II	2115.33	0.67	0.85	0.14	0.55	0.90
Classe IV	12553.44	1.11	0.48	0.57	0.72	1.76

Os resultados dos ensaios de validação do NT-proBNP em amostras de soros refrigeradas e congeladas mostraram valores de CV_I e CV_T semelhantes aos encontrados pelos fabricantes (Roche). Os coeficientes de variação da dosagem do NT-proBNP definidos pela Roche são respectivamente 1.8% a 2.7% para imprecisão intra-ensaio (CV_I) e 2.2% a 3.2% para imprecisão total (CV_T) (FDA, 2002).

Procedeu-se à comparação dos valores dos CV_I médios obtidos no ensaio do NT-proBNP QIA, das triplicatas de alíquotas congeladas *versus* refrigeradas para amostras Classes I, II (Welch) e Classe IV (ANOVA) do experimento 2 (TABELA 7). Não foi observada diferença dos CV_I médios entre as diferentes formas de armazenamento em nenhuma das três classes.

TABELA 7
Comparação da variação dos CV_I médios do ensaio do NT-proBNP QIA das triplicatas de alíquotas congeladas x refrigeradas

Armazenamento	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	P
						Limite inferior	Limite superior			
Congelado	I	3	2.22	2.72	1.57	-4.53	8.97	.55	5.36	.456
Refrigerado		3	.78	.20	.11	.27	1.28	.55	.93	
Total		6	1.50	1.89	.77	-.49	3.49	.55	5.36	
Congelado	II	3	2.47	3.30	1.90	-5.73	10.67	.46	6.28	.421
Refrigerado		3	.55	.36	.21	-.36	1.47	.14	.85	
Total		6	1.51	2.34	.95	-.95	3.97	.14	6.28	
Congelado	IV	3	1.19	.53	.31	-.14	2.53	.70	1.77	.268
Refrigerado		3	.72	.34	.19	-.12	1.56	.48	1.11	
Total		6	.95	.47	.19	.45	1.46	.48	1.77	

Classes I e II (Welch) e Classe IV (ANOVA)

5.3 – Comparação entre os desempenhos dos dois ensaios no experimento 2

Quando compararam-se os valores de CV_I e CV_T dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA, em amostras congeladas e refrigeradas, nas três classes funcionais, observou-se que os coeficientes de variação intraensaio (CV_I) das amostras congeladas e refrigeradas, obtidos nos ensaios de BNP MEIA, foram estatisticamente superiores aos observados para os ensaios de NT-proBNP QIA, tanto quando considerou-se a forma de armazenamento (TABELA 8) quanto todas as amostras foram analisadas conjuntamente, independentemente da forma de armazenamento (TABELA 9).

TABELA 8

Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas congeladas e de alíquotas refrigeradas

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
					Limite inferior	Limite superior			
Congeladas									
NT-proBNP	9	1.96	2.23	.74	.24	3.67	.46	6.28	.002
BNP	9	10.19	6.15	2.05	5.45	14.92	4.80	24.25	
Total	18	6.07	6.17	1.45	3.00	9.14	.46	24.25	
Refrigeradas									
NT-proBNP	9	.68	.28	.09	.46	.90	.14	1.11	.001
BNP	9	11.28	6.46	2.15	6.31	16.25	4.64	25.46	
Total	18	5.98	7.03	1.65	2.48	9.48	.14	25.46	

Alíquotas congeladas (ANOVA) e alíquotas refrigeradas (Welch)

TABELA 9

Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas, congeladas e refrigeradas.

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
					Limite inferior	Limite superior			
NT-proBNP	18	1.32	1.67	.39	.48	2.15	.14	6.28	.000
BNP	18	10.73	6.15	1.44	7.68	13.79	4.64	25.46	
Total	36	6.03	6.52	.80	3.82	8.23	.14	25.46	

Welch

O coeficiente de variação total CV_T das amostras congeladas e o CV_T das amostras refrigeradas obtidos dos ensaios de BNP não foram estatisticamente superiores aos dos ensaios de NT-proBNP ($p=0.115$ e $p=0.057$ respectivamente). (TABELA 10).

Quando compararam-se os valores médios de CV_T dos ensaios de BNP e NT-proBNP de alíquotas, congeladas e refrigeradas, observou-se diferença estatisticamente significativa com $p=0.013$ (TABELA 11).

TABELA 10
Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas congeladas e de alíquotas refrigeradas

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
					Limite inferior	Limite superior			
Congeladas									
NT-proBNP	3	4.01	1.69	0.97	-0.20	8.22	2.28	5.67	.115
BNP	3	20.15	10.60	6.12	-6.19	46.49	13.22	32.36	
Total	6	12.08	11.14	4.55	0.37	23.78	2.28	32.36	
Refrigeradas									
NT-proBNP	3	1.24	0.45	0.26	0.11	2.37	0.90	1.76	.057
BNP	3	29.86	18.69	10.79	-16.57	76.30	13.75	50.36	
Total	6	15.55	19.63	8.01	-5.05	36.16	0.90	50.36	

ANOVA e Welch

TABELA 11
Comparação dos valores médios de CV_T do ensaio NT-proBNP QIA versus do ensaio BNP MEIA de alíquotas, congeladas e refrigeradas

	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
					Limite inferior	Limite superior			
NT-proBNP	6	2.62	1.87	.76	.65	4.59	.90	5.67	.013
BNP	6	25.00	14.59	5.95	9.68	40.32	13.22	50.36	
Total	12	13.81	15.33	4.42	4.07	23.55	.90	50.36	

Welch

Realizou-se também a análise de comparação dos valores de CV_I e CV_T dos dois ensaios, estratificando as amostras de acordo com a classe funcional e de acordo com a forma de armazenamento. Verificou-se que os valores de CV_I do ensaio BNP MEIA foram novamente superiores aos obtidos no ensaio NT-proBNP (TABELA 12). Os valores de CV_T , embora muito diferentes dos dois

ensaios (4.01 do NT-proBNP para 20.15 do BNP nas amostras congeladas, com $p=0.115$ e 1.24 do NT-proBNP para 29.86 do BNP nas amostras refrigeradas, com $p=0.057$), não foram estatisticamente diferentes, embora o valor de p do CV_T das amostras refrigeradas tenha sido bem próximo de 0.05.

TABELA 12
Comparação entre os valores de CV_I e CV_T do BNP MEIA e de NT-proBNP QIA em amostras congeladas e de amostras refrigeradas, nas três classes funcionais (experimento 2)*

Ensaio	Armazenamento	Classe funcional	CV_I Dia 1	CV_I Dia 2	CV_I Dia 3	CV_I médio	p	CV_T	p
NT-proBNP	Congelado	Classe I	0.55	0.75	5.36	2.22	0.002	4.01	.115
		Classe II	0.67	0.46	6.28	2.47			
		Classe IV	1.11	0.7	1.77	1.19			
BNP		Classe I	7.17	6.32	8.75	7.41		20.15	
		Classe II	16.01	8.58	24.25	16.28			
		Classe IV	6.54	4.8	9.32	6.89			
NT-proBNP	Refrigerado	Classe I	0.55	0.75	5.36	0.78	0.001	1.24	.057
		Classe II	0.67	0.85	0.14	0.55			
		Classe IV	1.11	0.48	0.57	0.72			
BNP		Classe I	7.17	7.8	14.39	9.78		29.86	
		Classe II	16.01	4.64	10.54	10.39			
		Classe IV	6.54	9.02	25.46	13.67			

*ANOVA

ESTUDOS DE ESTABILIDADE DOS ANALITOS

5.4 – Estudo da estabilidade do BNP

Utilizando-se dos dados obtidos nos dois experimentos, avaliou-se a estabilidade das amostras nas duas diferentes condições de armazenamento, através da determinação do índice de recuperação após 24 e 48 horas do dia da coleta (dia 1).

No Experimento 1, quando avaliou-se a estabilidade do BNP em alíquotas congeladas de pacientes classificados nas quatro diferentes classes funcionais, o índice de recuperação foi de 0.94 e 0.73 para a Classe I, 0.96 e 0.99 para a Classe II, 1.07 e 0.98 para a Classe III e 1.13 e 0.95 para a Classe IV após 2 e 3 dias respectivamente (TABELA 13).

TABELA 13
Percentual de recuperação em relação ao dia 1
BNP MEIA - Experimento 1- alíquotas congeladas

Tempo de determinação		Valores médios dos peptídeos	
		BNP,pg/mL	BNP,% de recuperação
Classe Funcional I	Dia 1	160.97	100
	Dia 2	151.60	94
	Dia 3	116.75	73*
Classe Funcional II	Dia 1	410.07	100
	Dia 2	392.64	96
	Dia 3	409.30	99
Classe Funcional III	Dia 1	801.13	100
	Dia 2	856.34	107
	Dia 3	785.79	98
Classe Funcional IV	Dia 1	896.66	100
	Dia 2	1013.53	113
	Dia 3	854.33	95

Observação: Dia 1: alíquotas frescas
 *p<0,05

A TABELA 14 mostra o detalhamento da análise estatística (ANOVA e Welch) dos valores médios do BNP MEIA para cada classe funcional do Experimento 1. É possível perceber que houve queda significativa nos valores médios de BNP após 48 horas de congelamento, nas amostras provenientes de paciente da classe funcional I. Nas demais classes, não houve variação significativa.

TABELA 14
Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA.
Experimento 1
Alíquotas congeladas

Dia	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
1	I	3	160.97	15.73	9.08	121.89	200.05	149.82	178.97	.026
2		3	151.60	11.85	6.84	122.16	181.04	137.94	159.03	
3		3	116.75	17.24	9.95	73.92	159.58	103.23	136.17	
Total		9	143.11	24.05	8.01	124.62	161.60	103.23	178.97	
1	II	3	410.07	101.67	58.69	157.51	662.63	320.92	520.80	.483
2		3	392.64	17.87	10.31	348.24	437.04	373.22	408.40	
3		3	409.30	6.65	3.84	392.77	425.83	401.62	413.27	
Total		9	404.00	52.42	17.47	363.71	444.30	320.92	520.80	
1	III	3	801.13	240.68	138.96	203.22	1399.04	618.87	1074	.884
2		3	856.34	196.12	113.23	369.14	1343.53	691.00	1073.0	
3		3	785.79	47.75	27.56	667.17	904.42	732.00	823.17	
Total		9	814.42	160.31	53.43	691.19	937.65	618.87	1074	
1	IV	3	896.66	129.83	74.96	574.1686	1219.24	758.00	1015.3	.342
2		3	1013.53	135.89	78.45	675.95	1351.11	856.83	10998	
3		3	854.33	110.36	63.71	580.17	1128.49	728.00	932.00	
Total		9	921.52	130.28	43.42	821.37	1021.67	728.00	1099	

Classes funcionais I, III e IV(ANOVA) e Classe II (Welch)

A análise dos dados obtidos no Experimento 2 mostrou índices de recuperação para as alíquotas congeladas de 0.85 e 0.77 para a Classe I, 0.86 e 0.49 para a

Classe II e 0.89 e 0.73 para a Classe IV após 2 e 3 dias respectivamente (TABELA15)

Os índices de recuperação para as alíquotas refrigeradas foram de 0.95 e 0.57 e para a Classe I, 0.98 e 0.82 para a Classe II e 0.46 e 0.35 para a Classe IV após 2 e 3 dias, respectivamente (TABELA15).

TABELA 15
Percentual de recuperação em relação ao dia 1
BNP MEIA - Experimento 2-
Alíquotas congeladas e refrigeradas

Tempo de determinação		Valores médios dos peptídeos	
		BNP,pg/mL	BNP,% de recuperação
Alíquotas congeladas			
Classe Funcional I	Dia 1	155.0	100
	Dia 2	131.3	85*
	Dia 3	119.6	77*
Classe Funcional II	Dia 1	326.9	100
	Dia 2	279.9	86
	Dia 3	159.1	49*
Classe Funcional IV	Dia 1	855.4	100
	Dia 2	765.3	89
	Dia 3	621.9	73**
Alíquotas refrigeradas			
Classe Funcional I	Dia 1	155.0	100
	Dia 2	147.1	94,8
	Dia 3	88.3	56,9**
Classe Funcional II	Dia 1	326.9	100
	Dia 2	321.1	98,2
	Dia 3	267.0	81,7
Classe Funcional IV	Dia 1	855.4	100
	Dia 2	396.2	46,3**
	Dia 3	303.3	35,4**

Observação: Dia 1: alíquotas frescas

p<0,05, ** p<0,01

As TABELAS 16 (alíquotas congeladas) e 17 (alíquotas refrigeradas) mostram os cálculos estatísticos, realizados pelo teste ANOVA, dos valores médios de

BNP MEIA para cada classe funcional do Experimento 2, quando foram realizados os ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA.

Nesta série de experimentos, observou-se queda significativa em todas as amostras analisadas, após armazenamento sob congelamento e sob refrigeração, exceto na Classe II das alíquotas refrigeradas.

TABELA 16
Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA.
Experimento 2
Alíquotas congeladas

Dia	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
1	I	3	155.03	11.12	6.42	127.39	182.66	144.80	166.87	.013
2		3	131.33	8.29	4.79	110.71	151.94	126.42	140.91	
3		3	119.59	10.46	6.04	93.59	145.58	108.27	128.91	
Total		9	135.31	17.88	5.96	121.56	149.06	108.27	166.87	
1	II	3	326.90	52.32	30.21	196.92	456.89	290.90	386.93	.005
2		3	279.91	24.00	13.85	220.28	339.54	252.66	297.92	
3		3	159.11	38.58	22.27	63.26	254.95	126.22	201.58	
Total		9	255.31	82.58	27.52	191.82	318.79	126.22	386.93	
1	IV	3	855.38	55.98	32.32	716.32	994.45	804.90	915.59	.004
2		3	765.25	36.70	21.18	674.08	856.41	742.53	807.59	
3		3	621.88	57.97	33.47	477.86	765.90	580.69	688.18	
Total		9	747.50	111.17	37.05	662.04	832.96	580.69	915.59	

Classes funcionais I, II e IV(ANOVA)

TABELA 17
Detalhamento da análise estatística dos valores de BNP MEIA.
Experimento 2
Alíquotas refrigeradas

Dia	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
1	I	3	155.03	11.12	6.42	127.39	182.66	144.80	166.87	.001
2		3	147.05	11.46	6.61	118.57	175.53	136.10	158.97	
3		3	88.32	12.71	7.33	56.74	119.89	75.13	100.49	
Total		9	130.13	33.15	11.05	104.64	155.62	75.13	166.87	
1	II	3	326.90	52.32	30.21	196.92	456.89	290.90	386.93	.152
2		3	321.14	14.91	8.61	284.08	358.19	306.10	335.93	
3		3	266.95	28.13	16.24	197.06	336.84	240.86	296.76	
Total		9	305.00	41.93	13.97	272.76	337.23	240.86	386.93	
1	IV	3	855.38	55.20	32.32	716.32	994.45	804.90	915.59	.000
2		3	396.26	35.75	20.64	307.43	485.09	354.99	417.96	
3		3	303.30	77.21	44.58	111.48	495.11	221.99	375.64	
Total		9	518.31	261.0	87.00	317.69	718.94	221.99	915.59	

Classes funcionais I e IV(ANOVA) e Classe II (Welch)

5.5 – Estudo da estabilidade do NT-proBNP

O estudo de estabilidade do NT-proBNP foi feito com os dados obtidos no Experimento 2, com amostras classificadas funcionalmente nas classes I, II e IV, armazenadas congeladas e refrigeradas.

O índice de recuperação para as alíquotas congeladas foi de 1.01 e 0.94 para a Classe I, 1.0 e 0.90 para a Classe II e 1.03 e 0.99 para a Classe IV após 2 e 3 dias, respectivamente (TABELA 18). O índice de recuperação para as alíquotas refrigeradas foi de 0.99 e 0.98 para a Classe I, 0.99 e 0.98 para a Classe II e 1.04 e 1.02 para a Classe IV após 2 e 3 dias, respectivamente (TABELA 18).

TABELA 18
Percentual de recuperação em relação ao dia 1
NT-proBNP QIA - Experimento 2
Alíquotas congeladas e refrigeradas.

Tempo de determinação		Valores médios dos peptídeos	
		NT-proBNP, pg/L	NT-proBNP,% de recuperação
Alíquotas congeladas			
Classe Funcional I	Dia 1	1450	100
	Dia 2	1471	101
	Dia 3	1372	94
Classe Funcional II	Dia 1	2133	100
	Dia 2	2141	100
	Dia 3	1937	90
Classe Funcional IV	Dia 1	12298	100
	Dia 2	12739	103**
	Dia 3	12198	99
Alíquotas refrigeradas			
Classe Funcional I	Dia 1	1450	100
	Dia 2	1449	100
	Dia 3	1426	98
Classe Funcional II	Dia 1	2133	100
	Dia 2	2113	99
	Dia 3	2099	98*
Classe Funcional IV	Dia 1	12298	100
	Dia 2	12766	104**
	Dia 3	12596	102*

Observação: Dia 1: alíquotas frescas
p<0,05, ** p<0,01

As TABELAS 19 (alíquotas congeladas) e 20 (alíquotas refrigeradas) mostram os cálculos estatísticos (ANOVA e Welch) dos valores médios do NT-proBNP QIA para cada classe funcional do experimento 2, quando foram realizados os ensaios BNP MEIA e o NT-proBNP QIA.

É possível perceber que houve queda significativa nos valores médios de NT-proBNP ao longo do período de congelamento, nas amostras provenientes de pacientes das classes funcionais II e IV. Considerando as amostras mantidas

sob refrigeração, houve queda significativa na classe IV. Nas demais classes, não houve queda significativa.

TABELA 19
Detalhamento da análise estatística dos valores de NT-proBNP QIA.
Experimento 2
Alíquotas congeladas

Dia	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
1	I	3	1450.66	8.02	4.63	1430.74	1470.59	1443.00	1459.00	.069
2		3	1471.33	11.01	6.35	1443.97	1498.69	1464.00	1484.00	
3		3	1373.00	73.54	42.46	1190.30	1555.69	1298.00	1445.00	
Total		9	1431.66	58.43	19.47	1386.74	1476.58	1298.00	1484.00	
1	II	3	2133.66	14.29	8.25	2098.15	2169.17	2118.00	2146.00	.023
2		3	2133.66	14.29	8.25	2098.15	2169.17	2118.00	2146.00	
3		3	1937.66	121.64	70.22	1635.49	2239.83	1802.00	2037.00	
Total		9	2068.33	115.78	38.59	1979.33	2157.33	1802.00	2146.00	
1	IV	3	12298.00	136.12	78.58	11959.85	12636.14	12141.00	12383.00	.012
2		3	12739.33	89.52	51.68	12516.94	12961.72	12651.00	12830.00	
3		3	12198.66	215.56	124.45	11663.18	12734.14	11968.00	12395.00	
Total		9	12412.00	283.50	94.509	12194.1	12629.9	11968.00	12830.00	

Classes funcionais I e IV(ANOVA) e Classe II (Welch)

TABELA 20
Detalhamento da análise estatística dos valores de NT-proBNP QIA.
Experimento 2
Alíquotas refrigeradas

Dia	Classe funcional	N	Média	Desvio padrão	Erro padrão	Média para intervalo de confiança de 95%		Mínimo	Máximo	p
						Limite inferior	Limite superior			
1	I	3	1450.66	8.02	4.63	1430.74	1470.59	1443.00	1459.00	.072
2		3	1449.66	12.50	7.21	1418.60	1480.72	1441.00	1464.00	
3		3	1426.66	13.20	7.62	1393.86	1459.46	1415.00	1441.00	
Total		9	1442.33	15.39	5.13	1430.49	1454.16	1415.00	1464.00	
1	II	3	2133.66	14.29	8.25	2098.15	2169.17	2118.00	2146.00	.050
2		3	2113.66	18.00	10.39	2068.92	2158.40	2096.00	2132.00	
3		3	2098.66	2.88	1.66	2091.49	2105.83	2097.00	2102.00	
Total		9	2115.33	19.11	6.37	2100.63	2130.02	2096.00	2146.00	
1	IV	3	12298.0	136.12	78.58	11959.85	12636.14	12141.00	12383.0	.003
2		3	12766.3	61.64	35.59	12613.19	12919.47	12696.00	12811.0	
3		3	12596.0	71.58	41.32	12418.18	12773.81	12538.00	12676.0	
Total		9	12553.4	221.37	73.79	12383.27	12723.60	12141.00	12811.0	

Classes funcionais I e IV(ANOVA) e Classe II (Welch)

A TABELA 21 mostra a comparação da porcentagem de recuperação dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA no experimento 2. Demonstrou-se que a recuperação do BNP foi estatisticamente menor nas amostras congeladas das três classes funcionais estudadas e também nas amostras refrigeradas das classes funcionais I e IV, quando comparadas à recuperação do ensaio NT-proBNP.

TABELA 21
Comparação entre os percentuais de recuperação dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA

Tempo de determinação	Valores médios dos peptídeos				
	BNP,pg/mL	BNP,% de recuperação	NT-proBNP, pg/L	NT-proBNP,% de recuperação	
Alíquotas congeladas					
Classe Funcional I	Dia 1	155	100	1450	100
	Dia 2	131	85*	1471	101
	Dia 3	119	77*	1372	95
Classe Funcional II	Dia 1	326	100	2133	100
	Dia 2	279	86	2141	100
	Dia 3	159	49*	1937	91
Classe Funcional IV	Dia 1	855	100	12298	100
	Dia 2	765	89	12739	103**
	Dia 3	621	73**	12198	99
Alíquotas refrigeradas					
Classe Funcional I	Dia 1	155	100	1450	100
	Dia 2	147	95	1449	99
	Dia 3	88	57**	1426	98
Classe Funcional II	Dia 1	326	100	2133	100
	Dia 2	321	98	2113	99
	Dia 3	267	82	2098	98*
Classe Funcional IV	Dia 1	855	100	12298	100
	Dia 2	396	46**	12766	103**
	Dia 3	303	35**	12596	102*

Observação: Dia 1: alíquotas frescas
 *p<0,05, ** p<0,01

5.6 – Síntese dos resultados

Nas tabelas abaixo, apresentamos uma síntese dos resultados mais relevantes, com especial interesse nos valores de CV_I e CV_T médios determinados para os ensaios BNP MEIA e NT-proBNP, nos dois experimentos realizados (TABELAS 22 e 23), e no percentual de recuperação dos ensaios em relação ao tempo de estocagem à condição de armazenamento (TABELA 24).

TABELA 22
 CV_I médios dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA
nos experimentos 1 e 2

	BNP Amostras congeladas (Exp 1)	BNP Amostras congeladas (Exp 2)	BNP Amostras refrigeradas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras congeladas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras refrigeradas (Exp 2)
Classe I	10.78	7.41	9.78	2.22	0.78
Classe II	10.32	16.28	10.39	2.47	0.55
Classe III	19.67	NR	NR	NR	NR
Classe IV	13.60	6.89	13.67	1.19	0.72

NR: não realizado

TABELA 23
 CV_T médios dos ensaios BNP MEIA e NT-proBNP QIA
nos experimentos 1 e 2

	BNP Amostras congeladas (Exp 1)	BNP Amostras congeladas (Exp 2)	BNP Amostras refrigeradas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras congeladas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras refrigeradas (Exp 2)
Classe I	16.81	13.22	25.48	4.08	1.07
Classe II	12.98	32.36	13.75	5.67	0.90
Classe III	19.68	NR	NR	NR	NR
Classe IV	14.15	14.87	50.36	2.28	1.76

NR: não realizado

TABELA 24
Percentual de recuperação dos analitos em relação a tempo e forma de estocagem

		BNP Amostras congeladas (Exp 1)	BNP Amostras congeladas (Exp 2)	BNP Amostras refrigeradas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras congeladas (Exp 2)	NT-proBNP Amostras refrigeradas (Exp 2)
Após 24 horas	Classe I	94	85	95	101	99
	Classe II	96	86	98	100	99
	Classe III	107	NR	NR	NR	NR
	Classe IV	113	89	46	103	103
Após 48 horas	Classe I	73*	77	57	95	98
	Classe II	99	49	82	91	98
	Classe III	98	NR	NR	NR	NR
	Classe IV	95	73	35	99	102

NR: não realizado

6 – Discussão

Apesar da larga utilização mundial de ensaios de BNP e NT-proBNP para diagnóstico, prognóstico e avaliação de tratamento da insuficiência cardíaca, pouco se estudou sobre o desempenho dos ensaios automatizados atualmente disponíveis e a estabilidade das amostras em diferentes condições de armazenamento, no contexto de atuação de um laboratório clínico.

A recomendação da utilização dos ensaios de peptídeos natriuréticos é no contexto do pronto atendimento, para a triagem diagnóstica, classificação e diagnóstico diferencial da dispnéia. Nessa situação, os ensaios são feitos imediatamente após a coleta, em amostras frescas, por fornecem informações rápidas e precisas para esses fins (CLERICO et EMDIN, 2004, MAISEL et al, 2001).

Entretanto, conhecer a estabilidade das amostras em diferentes condições de armazenamento pode ser muito útil em diversas situações, como por exemplo: reteste, impedimento técnico, estudos clínicos retrospectivos e acompanhamento de pacientes oriundos de regiões distantes de centros de referência e tratamento. Esses pacientes muitas vezes não dispõem de nenhuma propedêutica já consagrada para avaliação da função cardíaca, como é o caso de pacientes chagásicos que vivem em zona rural.

A garantia da qualidade no laboratório clínico é fundamental. O pleno conhecimento do desempenho dos métodos entra seguramente nos critérios de especificação de qualidade e influencia diretamente a abrangência de utilização dos testes.

Apple e colaboradores comentam, quando discutem sobre especificações de qualidade para ensaios de BNP e NT-proBNP, que são necessárias informações mais precisas sobre os ensaios disponíveis, dentre elas, a caracterização dos calibradores (animal ou humano, nativo ou recombinante), descrição da curva de calibração, especificidade do ensaio, melhor detalhamento dos anticorpos empregados no ensaio e caracterização do segmento do peptídeo reconhecido pelos anticorpos. Outra informação importante é a descrição de interferências relevantes por altas concentrações de constituintes endógenos, tais como, hemoglobina, triglicérides, bilirrubina e paraproteínas. Tais informações nem sempre são disponibilizadas pelos fabricantes.

O autor também comenta que a imprecisão analítica total obtida com os diferentes ensaios comerciais disponíveis para BNP e NT-proBNP não é uniforme, e em geral, ensaios de plataformas automatizadas apresentam desempenhos melhores que os ensaios manuais ou remotos e recomenda imprecisão total desejável inferior a 15% para os peptídeos natriuréticos (APPLE et al, 2005).

A imprecisão de um ensaio pode ser expressa pelo coeficiente de variação. No valor do coeficiente de variação total estão imbutidas diversas variáveis, dentre elas a estabilidade do analito, o desempenho do método e a atuação do laboratório executor, com suas boas práticas e sua qualidade interna. Um valor baixo de CV_I é condição essencial para o bom desempenho do método, mas é necessário que as outras variáveis também sejam controladas para que ensaio apresente-se robusto, com ampla aplicação diagnóstica, prognóstica e de evolução de tratamento.

Nosso trabalho visou contribuir analisando o desempenho de metodologias automatizadas para quantificação de peptídeos natriuréticos, BNP MEIA e NT-proBNP QIA, e o impacto que formas de armazenamento, frequentemente utilizadas na rotina laboratorial, possa ter sobre os resultados dos ensaios.

Em nossos estudos de precisão, não foi possível reproduzir os valores de CV_I e CV_T divulgados pelo fabricante para o ensaio BNP MEIA. Em duas diferentes ocasiões (Experimento 1 e Experimento 2), os valores foram sistematicamente superiores aos apregoados. Já em relação ao ensaio NT-proBNP QIA, os valores de CV_I e CV_T estavam dentro da faixa de valores preconizados pelos fabricantes.

Quando se compararam os valores de CV_I e CV_T do BNP MEIA e NT-proBNP QIA em amostras congeladas e refrigeradas, nas três classes funcionais, observou-se que os coeficientes de variação obtidos nos ensaios de BNP MEIA foram estatisticamente superiores aos observados para os ensaios de NT-proBNP QIA ($p < 0.05$), exceto para o CV_T das alíquotas congeladas e refrigeradas. Nestas condições, mesmo não tendo havido diferença significativa, o valor médio de CV_T do NT-proBNP QIA foi bem inferior ao encontrado no BNP MEIA (4.01 para 20.15 para as amostras congeladas e 1.24 para 29.86 para as amostras refrigeradas). Ressalta-se que o CV_T médio do ensaio do NT-proBNP QIA em alíquotas congeladas foi aproximadamente três vezes o valor do CV_T das alíquotas refrigeradas (4.01 para 1.24), à custa principalmente do CV_T do dia 3. É possível que interferências pré-analíticas possam ter contribuído para este achado. Fatores como a não homogeneização ou o não descongelamento total da amostra poderiam justificar o alto CV_T encontrado no terceiro dia do experimento 2.

Apesar dos cuidados relativos aos fatores pré-analíticos fazerem parte das boas práticas de laboratório e os laboratórios envolvidos neste presente trabalho possuírem qualificação indiscutível, com programas instituídos de controle e gerenciamento de qualidade interno e externo (programas de proficiência) e serem acreditados ONA (Organização Nacional de Acreditação) com excelência, na rotina, eventualidades adversas ainda são passíveis de ocorrer. O fato deste provável fator, a não homogeneização da amostra, ter afetado preferencialmente o ensaio NP-proBNP sugere que este seja mais sensível à homogeneização inadequada e, desta forma, recomendações específicas deveriam ser incluídas pelo fabricante nas instruções.

Muller e colaboradores também estudaram a precisão desses dois métodos e obtiveram os seguintes dados para o BNP: CV_I de 6% e CV_T de 8.1% numa concentração média de 108 pg/mL, CV_I de 4.3% e CV_T de 7.5% numa concentração média de 524 pg/mL, CV_I de 5.1% e CV_T de 10.3% numa concentração média de 2117 pg/mL. Para o ensaio de NT-proBNP no Elecsys os dados foram: CV_I de 1.7% e CV_T de 3.8% numa concentração média de 246 pg/mL, CV_I de 1.1% e CV_T de 4.7% numa concentração média de 891 pg/mL, CV_I de 0.9% e CV_T de 2.2% numa concentração média de 10666 pg/mL (MULLER et al, 2004).

De forma a facilitar a comparação entre nossos achados e os de Muller e colaboradores, na TABELA 25 apresentamos os respectivos resultados de CV_I e do CV_T e os valores fornecidos pelos fabricantes para os ensaios de BNP MEIA e NT-proBNP QIA.

TABELA 25

Resultados de desempenho dos ensaios de BNP MEIA e NT-proBNP QIA dos trabalhos de Muller et al, Andrade et al e fabricantes Abbott (BNP) e Roche (NT-proBNP)

BNP MEIA						NT-proBNP QIA					
CV_I (M)	CV_I (A)	CV_I (An)	CV_T (M)	CV_T (A)	CV_T (An)	CV_I (M)	CV_I (R)	CV_I (An)	CV_T (M)	CV_T (R)	CV_T (An)
4.3 a	4.3 a	6.9 a	7.5 a	6.5 a	13.2 a	0.9 a	1.8 a	1.2 a	2.2 a	2.2 a	2.3 a
6.0%	6.3%	16.3%	10.3%	9.4%	50.4%	1.7%	2.7%	2.5%	4.7%	3.2%	5.7%

CV_I coeficiente de variação intraensaio; CV_T coeficiente de variação total.

(M) Muller et al; (A) Abbott; (R) Roche; (An) Andrade et al

No trabalho de Muller e colaboradores, utilizou-se outro desenho experimental para avaliação da precisão. Obteve-se CV_I a partir de três misturas de amostras ensaiadas em duas corridas por dia durante 20 dias, gerando um maior número de dados para cálculos dos CV_I . Acreditamos que esse fator contribuiu para a variação do desvio padrão ter sido inferior ao do nosso trabalho.

Outro trabalho que avaliou o desempenho de ensaios automatizados foi o de Wu e colaboradores que usaram o protocolo modificado do EP15-A do NCCLS no estudo de precisão do ensaio automatizado de BNP da Bayer ADVIA Centaur (*Bayer ADVIA Centaur Automated B-Type Natriuretic Peptide Assay*). Foram testados três níveis de controles e duas misturas de amostras para cálculo dos CV_I (intra-ensaio) (n=21) e CV_T (n=26 corridas), usando pares de sangue coletados com diferentes anticoagulantes, respectivamente EDTA, citrato de sódio, heparina lítica, fluoreto de sódio e soro. O ensaio em questão é do tipo quimioluminescente, de captura, que usa dois anticorpos de dois

sítios produzidos pela Shionogi Ltda e que são os mesmos empregados nos ensaios imunorradiométricos ShionoRIA. O anticorpo biotilado de captura é direcionado à porção C-terminal do peptídeo (aminoácidos 27-32) e o anticorpo marcado é direcionado à porção em anel do BNP (aminoácidos 14-21). Os resultados obtidos pelos autores foram: CV_I de 1.8 a 3.1% para os controles e 1.7 a 2.4% para os *pools* e CV_T de 2.4 a 3.4% para os controles e 2.8 a 2.9% para os *pools*.

Nossos resultados apontaram pior desempenho dos ensaios de BNP MEIA que os autores citados. Acreditamos que um dos fatores que pode ter contribuído para esses achados foi o impacto das condições de armazenamento que induziram à perda da imunorreatividade, o que certamente contribuiu para o maior CV_T . Este fator não estava presente nos estudos anteriores, devido às diferenças do desenho experimental.

Nossos dados mostraram que após o ensaio de alíquotas refrigeradas e congeladas, a dosagem de BNP MEIA no equipamento AxSYM nos dias 2 e 3 não se manteve próxima aos valores do dia 1 ou das amostras frescas, perdendo imunorreatividade, o que pode correlacionar-se com sua degradação durante essas formas de armazenamento.

Alguns pesquisadores já haviam correlacionado essa degradação com materiais que compõem os tubos para coleta sanguínea e com o contato com fatores de coagulação sanguínea, especialmente a calicreína, que tem um papel importante na digestão do BNP (SHIMIZU et al, 2001). O fator XII é ativado quando em contato com cargas negativas do vidro, kaolin, sulfato dextran e sulfatide. Uma vez ativado, o fator XIIa converte a pré-calicreína em

calicreína, que por sua vez ativa o fator XII em XIIa. O fator XIIa ativa também o zimogênio do XIa, num sistema multi-enzimático de ativação por contato. Nesse trabalho, os autores sugerem que pelo menos uma protease ativada pela superfície de vidro desempenharia importante papel na digestão do BNP, além de outras como a endopeptidase neural que é largamente distribuída em vários órgãos e neutrófilos (SHIMIZU et al, 2001). Nesse trabalho, os autores discutem sobre eventual relação entre a formação e degradação dos hormônios vasoativos e a ativação dos fatores de coagulação, uma vez que mecanismos fisiopatológicos das doenças cardiovasculares envolvem também os amplos caminhos da coagulação (SHIMIZU et al, 2001).

Já Tsugi e colaboradores estudaram a estabilidade do BNP usando um ensaio imunorradiométrico (IRMA) de dois anticorpos de dois sítios na presença de inibidor da calicreína e aprotinina. Os autores mostraram que o BNP exógeno incorporado ao plasma mostrou 75% de degradação, mesmo no tempo zero, sem ainda efeito de armazenamento. Essa perda precoce do BNP foi parcialmente prevenida com a adição de aprotinina, um inibidor de serina protease. A adição de aprotinina a amostras de plasma misturadas com o BNP exógeno e congeladas em diferentes temperaturas também preveniu a degradação até dois meses após o processo (TSUGI et al, 1994).

O nosso trabalho corrobora os dados de Muller e colaboradores (2004) que mostraram que sem o uso de um estabilizante ou inibidor de protease não há como ter uma boa recuperação do BNP que seja similar aos resultados da alíquota de plasma fresca obtida logo após a coleta e centrifugação (valor basal). O congelamento das alíquotas no nosso trabalho não aumentou a recuperação em comparação às alíquotas refrigeradas como acontece com

muitos analitos, sugerindo que realmente aconteça a degradação logo após a coleta ou ainda durante a centrifugação, mesmo considerando que esse tempo tenha sido o mínimo possível (dentro das primeiras 4 horas).

Já no ensaio de NT-proBNP QIA não houve perda significativa da imunorreatividade em nenhum dos três dias, nas duas diferentes formas de armazenamento, o que mostra que não há degradação importante durante a estocagem. Isso também confirma os resultados de Mueller e colaboradores que usaram em seu protocolo alíquotas congeladas, porém num intervalo maior de estocagem. Nesse trabalho, os autores se propuseram a avaliar a duração da estabilidade do BNP e NT-proBNP em alíquotas de plasma congelados de amostras com valores de BNP entre 30 e 420 pg/mL, a -20° Celcius sem a adição de inibidores da protease (aprotinina). Os ensaios utilizados foram BNP MEIA da Abbott (AxSYM) e NT-proBNP QIA da Roche (Elecsys). A recuperação média do BNP foi menos de 70% após 1 dia de estocagem e diminuiu para menos de 50% após 2 a 4 meses de congelamento e todos os valores obtidos após a recuperação foram estatisticamente menores que os basais, com níveis de significância variando de $p < 0.05$ até $p < 0.001$, usando testes t-pareados. Ao contrário, a recuperação média do NT-proBNP foi geralmente acima de 90%, independente da duração do armazenamento variando de 91 até 112% após 3 meses de estocagem. Os autores discutem se esse achado seria devido às características dos anticorpos empregados e se outros ensaios usando diferentes anticorpos poderiam apresentar resultados diferentes em relação à degradação durante o armazenamento (MULLER et 2004).

Essa hipótese pode ser reforçada pelo trabalho de Wu e colaboradores (2004) que estudaram a recuperação da imunorreatividade, em outro ensaio automatizado, *Bayer ADVIA Centaur Automated B-Type Natriuretic Peptide Assay*. O estudo da estabilidade, usando sangue total mantido à temperatura ambiente, indicou média de recuperação do BNP igual a 96% do valor basal após 24 horas, e 80% após 48 horas. Em plasma mantido a 4º Celcius por mais 24 horas, a recuperação média foi de 91%. Essa baixa perda da reatividade pode então ser intrínseca ao método.

Apesar de nossos dados apontarem para um desempenho do ensaio BNP MEIA aquém do esperado, acreditamos que seu emprego possa ser bem conduzido em situações específicas. Isto é, a abrangência de utilização dos ensaios de peptídeos natriuréticos deve ser orientada.

Os artigos da literatura já indicaram o uso, indistintamente, dos ensaios de peptídeos para triagem, classificação e estratificação, prognóstico e monitorização do tratamento da insuficiência cardíaca (CLERICO et EMDIN, 2004, MAISEL et al, 2001).

Contudo, após os nossos resultados, julgamos que ensaios com diferentes desempenhos devam ter empregos diferentes.

Considerando os ensaios com maiores coeficientes de variação, seu uso justifica-se, por exemplo, na triagem diagnóstica de disfunção ventricular em quadros de dispnéia, especialmente no contexto de pronto atendimento, quando se empregam amostras frescas e a rapidez do resultado é fator determinante para as tomadas de decisão do médico assistente.

Entretanto, não estão indicados para categorização de pacientes ou para monitorização clínica. A categorização de pacientes em diferentes classes funcionais pode ser comprometida pela grande variação, havendo sobreposição importante dos valores entre as classes e, conseqüentemente, interferindo nas decisões clínicas.

Na monitorização clínica, sustenta-se que, a variação biológica e estabilidade de um analito juntamente com a imprecisão do método devam ser mínimas para que as alterações numéricas de resultados sequenciais em um indivíduo indiquem, com alta probabilidade, que são mudanças significativas e não reflitam simplesmente uma variação analítica (BASQUES, 2006).

No caso dos peptídeos natriuréticos, sabe-se que sua variação biológica é expressiva. O emprego de ensaios de alta imprecisão analítica na sua determinação torna a avaliação de resultados seriados de difícil interpretação.

Uma das propostas do uso dos peptídeos natriuréticos é monitorar o sucesso de tratamento dos sintomas da insuficiência cardíaca, uma vez que estudos preliminares têm sugerido que o uso de doses terapêuticas de drogas na insuficiência cardíaca pode ser acompanhado mais efetivamente pelas dosagens do BNP e NT-proBNP do que apenas pelo julgamento clínico. Entretanto, torna-se decisivo considerar o efeito da variação biológica e da imprecisão analítica. Isto se torna crítico uma vez que os pacientes em questão são aqueles que apresentam maiores níveis séricos de peptídeos natriuréticos. Assim, variações aparentemente significativas no valor absoluto das dosagens podem estar dentro das variações analíticas.

Considerando o CV_T de 25.00% que tivemos no ensaio de BNP MEIA e imaginando uma situação clínica hipotética em que a dosagem de BNP foi inicialmente 500 pg/mL, a variação possível no resultado seria +/- 120 pg/mL. Uma dosagem seriada para acompanhamento de tratamento mostrando valor de 620 pg/mL não significará necessariamente baixa eficácia terapêutica.

Se considerarmos o ensaio do NT-proBNP QIA que teve um CV_T máximo de aproximadamente 5%, variações no valor absoluto das dosagens devem indicar alteração significativa com maior probabilidade.

No caso da monitoração terapêutica, uma boa estratégia seria usar o cálculo da diferença crítica entre resultados (RCV), que como já apresentado anteriormente, representa o percentual mínimo significativo que indica declínio em relação às concentrações basais, após o início do tratamento (FRASER, 2001; WU, 2006) e é estimado a partir da variação analítica e da variação biológica intra-individual tomada de banco de dados.

Finalmente, à luz do que foi exposto, podemos concluir que as estratégias de mensuração dos peptídeos natriuréticos podem apresentar-se insatisfatórias se não forem consideradas as múltiplas variáveis envolvidas, em todo o processo propedêutico, desde a indicação precisa dos testes, os fatores relacionados às fases pré, intra e pós analítica, e a justa interpretação dos resultados por parte do médico solicitante. A utilização ampliada desses ensaios deve sempre obedecer aos preceitos das boas práticas clínicas e laboratoriais.

7 – Conclusões

- A recuperação do BNP foi estatisticamente menor, tanto em amostras congeladas quanto nas refrigeradas, que a recuperação do NT-proBNP.
- Os resultados dos ensaios de precisão do BNP MEIA em amostras de soros refrigeradas e congeladas mostraram CV_I e CV_T superiores aos encontrados pelos fabricantes (Abbott).
- Os resultados dos ensaios de validação do NT-proBNP em amostras de soros refrigeradas e congeladas mostraram CV_I e CV_T semelhantes aos encontrados pelos fabricantes (Roche).
- Não foi observada diferença dos CV_I médios entre as diferentes formas de armazenamento para o BNP MEIA e para o NT-proBNP QIA .
- Os coeficientes de variação intraensaio (CV_I) das amostras congeladas e refrigeradas, obtidos nos ensaios de BNP, foram estatisticamente superiores aos observados para os ensaios de NT-proBNP.

8 – Considerações finais

Acreditamos que a contribuição do nosso trabalho foi evidenciar que há de se ter preocupação com formas de armazenamento de amostras e efeitos de degradação por estocagem para realização dos ensaios de peptídeos natriuréticos, pelo impacto na recuperação. Como os nossos resultados mostraram uma recuperação da imunorreatividade entre 90,8 a 103,8% para a dosagem do NT-proBNP em amostras (soros) congeladas e refrigeradas, podemos concluir que amostras de pacientes oriundos de regiões distantes dos centros de referência e tratamento poderiam ser enviadas pelo correio e serem ensaiadas posteriormente por esse ensaio. Um exemplo dessa situação seria o caso de pacientes chagásicos que muitas vezes moram em zona rural distante dos serviços médicos de referência. Sabemos que dificilmente a zona endêmica dessa doença coincide com zona urbana, tornando complicado a avaliação e monitorização da evolução da cardiopatia nesses pacientes. Nesses casos, recomendamos o envio de amostras colhidas sem anticoagulante, já centrifugadas e mantidas sob refrigeração entre 2-8° Celcius para o laboratório executante dos ensaios em até 48 horas após a coleta, pois esse foi o tempo máximo de estocagem estudado pelo nosso trabalho.

Além disso, aumentamos a nossa convicção que é necessário conhecer o desempenho dos ensaios atuais e novos para dosagem dos peptídeos natriuréticos, assim como avaliar todas as informações fornecidas pelos fabricantes para que possamos estabelecer especificações de qualidade adequadas e baseadas em dados de consenso na literatura.

Os ensaios de precisão realizados pelos fabricantes muitas vezes utilizam amostras controles tratadas quimicamente, tratamento esse que reduz em muito a influência do efeito matriz e tende a produzir resultados diferentes de amostras clínicas.

No nosso estudo de precisão, utilizamos amostras de pacientes não processadas quimicamente e sem uso de estabilizantes e, portanto mais próximas das condições enfrentadas no cotidiano dos laboratórios clínicos hospitalares e ambulatoriais.

Como nosso trabalho foi desenvolvido nas suas duas etapas ou experimentos em laboratórios clínicos, ambientes muito diferentes dos laboratórios de centros de pesquisa ou dos laboratórios de produção industrial dos insumos (kits e reagentes), podemos concluir que esses também são ambientes propícios à produção científica.

9 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 American Heart Association 2005, disponível em www.americanheart.org, acessado em dezembro de 2008
- 2 Anand-Srivastava M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. *Peptides* 2005; Jun;26(6):1044-59
- 3 Apple F.S. et al. National Academy of Clinical Biochemistry e IFCC Committee for Standardization of Markers of Cardiac Damage Laboratory Medicine Practice Guidelines: Analytical Issues for Biomarkers of Heart Failure. *Circulation* 2007; 116:e95-e98
- 4 Apple F.S. et al. Quality specifications for B-type natriuretic peptide assays. *Clin. Chem.* 2005; 51:3; 486-493
- 5 Barbosa M.M. et al. N-terminal proBNP in patients with Chagas's disease a marker of systolic and diastolic dysfunction of the left ventricle. *Eur. J. Echocardiography* 2006; 03-011
- 6 Basques J.C. Especificações da Qualidade Analítica 2006
- 7 Buckley M.G. et al. Cardiac peptide stability, aprotinin and room temperature: importance of assessing cardiac function in clinical practice. *Clinical Science* 1999; 97,689-695
- 8 Chen H.H., Burnett JC Jr. The natriuretic peptides in heart failure: diagnostic and therapeutic potentials. *Proc. Assoc. Am. Physicians* 1999; Sep-Oct;111:406-16
- 9 Clerico A. et Emdin M. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin. Chem.* 2004 ;50(1):33-50.
- 10 Cotlove E., Harris E. K. et Williams G. Z. Biological and analytic components of variation in long-term studies of serum constituents in normal subjects. *Clin. Chem.* 1970; Vol. 16, No. 12; 1028-1032
- 11 Ewald B. et al. Meta-analysis of B type natriuretic peptide and N-terminal pro B natriuretic peptide in the diagnosis of clinical heart failure and population screening for left ventricular systolic dysfunction. *Intern. Med. J.* 2008; Feb;38(2):101-13

- 12 Fernandes F., Mady C. Qual o valor de BNP na prática clínica em pacientes com insuficiência cardíaca? *Revista da Associação Médica Brasileira* 2003;Vol. 49(2)
- 13 Food and Drug Administration-FDA: 510 (k) Summary k033606 BNP AxSYM Abbott e k022516 NT-proBNP Elecsys Roche, disponível em <http://www.fda.gov/cdrh/dsma/dsmamain.html>, acessado em agosto de 2008
- 14 Fraser C.G. Biological variation: from principles to practice. Washington, DC: AACCC Press 2001: 46-47
- 15 Fraser C.G. Quality specifications for imprecision of B-type natriuretic peptide assay. *Clin. Chem.* 2005; 51: 1307-1308
- 16 Guimarães J.I. et al. Revisão das II Diretrizes da Sociedade Brasileira de Cardiologia para o Diagnóstico e Tratamento da Insuficiência Cardíaca. Grupo de Estudos de Insuficiência Cardíaca (GEIC), Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arq. Bras. Cardiol.* 2002; Vol. 79, (suplemento IV); 1-30
- 17 Harris E.K. et Yasaka T. On the calculation of a reference change for comparing two consecutive measurements. *Clin. Chem.* 1983 29/1 25-30
- 18 Heart Disease Estatistic-American Heart Association 2005, disponível em www.americanheart.org/statistics/07other.html, acessado em dezembro de 2008
- 19 Heringer-Walther S. et al. Brain Natriuretic Peptide predicts survival in Chagas's disease more effectively than atrial natriuretic peptide. *Heart* 2005; 1;385-387
- 20 Januzzi J.L. Jr. et al. Amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide testing for the diagnosis or exclusion of heart failure in patients with acute symptoms. *Am. J. Cardiol.* 2005; Feb 4;101(3A):29-38
- 21 Latini R. et al. Role of brain natriuretic peptide in the diagnosis and management of heart failure current concepts. *Journal of Cardiac Failure* 2002; Vol. 8(5):288-299
- 22 Lemos J.A. et al. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease. *The Lancet* 2003; 26 july; Vol. 362: 316-322
- 23 Lippi G. et al. Influence of sample matrix and storage on BNP measurement on the Bayer Advia Centaur. *Journ. of Clin. Lab. Anal.* 2007 21: 293-297

- 24 McKenna W.J. Report of the 1995 World Health Organization/International society and federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of Cardiomyopathies. *Circulation* 1996; 93: 842-843
- 25 Mair J. et al. The impact of cardiac natriuretic peptide determination on the diagnosis and management of heart failure. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001; Jul;39(7):571-88
- 26 Maisel A.S. B-Type Natriuretic Peptide Levels: A potential Novel "White Count" for Congestive Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure* 2001; Vol. 7 No. 2
- 27 Mehra M.R. et al. Obesity and suppressed B-type natriuretic peptide levels in heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 2004; 5 May, Vol. 43, Issue 9, Pages 1590-1595
- 28 Melo R.B.I., Parente G.B.O., Victor E.G. Measurement of Human Brain Natriuretic Peptide in pacientes with Chagas's Disease. *Arquivos Brasileiros de cardiologia* 2005 Vol. 84(2)
- 29 Morbidade Hospitalar do SUS, disponível em www.tabnet.datasus.gov.br, acessado em dezembro de 2008
- 30 Muller T. et al. Long term stability of endogenous B-type natriuretic peptide(BNP) and amino terminal proBNP(NT-proBNP) in frozen plasma samples. *Clin. Chem. Lab. Med* 2004: 42(8): 942-944
- 31 National Committee for Clinical Laboratory Standards. User demonstration of performance for precision and accuracy approved guideline. NCCLS document EP15-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001.
- 32 Omar F., van der Watt G.F., Pillay T.S. Reference change values: how useful are they? *J. Clin. Pathol.* 2008: 61; 426-427
- 33 Omland T. Advances in congestive heart failure management in the intensive care unit: B-type natriuretic peptides in evaluation of acute heart failure. *Crit. Care Med.* 2008; Jan;36(1 Suppl.):S17-27
- 34 Plebani M., Siest G. Natriuretic peptides and evidence-based quality specifications. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2006; 44(4): 355-357
- 35 Reference change value - RCV, disponível em www.labconsult.com.br, acessado em dezembro de 2008

- 36 Ribeiro A.L.P. et al. Brain Natriuretic Peptide based and left ventricular dysfunction in Chagas's disease. *The Lancet* 2002; 360: 461-462
- 37 Ribeiro A.L.P. et al. Brain Natriuretic Peptide and left ventricular dysfunction in Chagasic Cardiomyopathy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2004; 99(6): 645-649
- 38 Ribeiro A.L.P. et al. Brain Natriuretic Peptide based strategy to detect left ventricular dysfunction in Chagas's disease: a comparison with the conventional approach. *International Journal of Cardiology* 2006;109: 34-40
- 39 Seymour A.A. et al. Potentiation of natriuretic peptides by neutral endopeptidase inhibitors. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1995; Jan;22:63-9
- 40 SHAPE Survey Results to the general public, annual congress of the European Society of Cardiology in Vienna, September 2003: www.shapestudy.info, www.escardio.org, acessado em dezembro de 2008
- 41 Schmitt M., Cockcroft J.R. et Frenneaux M.P. Modulation of the natriuretic peptide system in heart failure: from bench to bedside? *Clinical Science* 2003 105, 141–160
- 42 Shimizu H. et al. Degradation of human brain natriuretic peptide (BNP) by contact activation of blood coagulation system. *Clin. Chim. Acta* 2001;305: 181-186
- 43 Swets J.A. Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science* 1988; Jun 3;240(4857):1285-93
- 44 Tsuji T. et al. Stabilization of human brain natriuretic peptide in blood samples. *Clin. Chem.* 1994;Vol. 40(4): 672-673
- 45 Wang T.J. et al. Impact of age and sex on plasma natriuretic peptide levels in healthy adults. *Am. J. Cardiol* 2002; 90: pp. 254–258
- 46 Wang T.J. et al. Impact of obesity on plasma natriuretic peptide levels. *Circulation* 2004(109); pp. 594–600
- 47 Weber M., Hamm C. Role of B-type natriuretic peptide (BNP) and NT-proBNP in clinical routine. *Heart* 2006; Jun;92(6):843-9
- 48 Weber M. et al. Genetic polymorphism of the type A human natriuretic peptide receptor (NPR-A) gene contributes to the interindividual variability in the BNP system. *European Journal of Heart Failure* 2008; 10: 482-489

49 Wu A.H.B. Serial testing of B-type natriuretic peptide and NT-proBNP for monitoring therapy of heart failure: the role of biologic variation in the interpretation of results. *Am. Heart J.* 2006; 152: 828-834

50 Wu A.H.B. et al. Analytical and clinical evaluation of the Bayer ADVIA Centaur automated B-type natriuretic peptides assay in patients with heart failure: a multisite study. *Clin. Chem.* 2004; 50:5 867-873

UFMG

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


Parecer nº. ETIC 0174/07

Interessado(a): Profa. Silvana Maria Elói Santos
Depto. Propedêutica Complementar
Fac. Medicina -UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de julho de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “**Utilização de um ensaio laboratorial quantitativo automatizado de dosagem de BNT na avaliação de função ventricular em pacientes chagásicos sintomáticos e assintomáticos**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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
Coordenadora do COEP-UFMG



Nova Lima, 29 de janeiro de 2.009.

Às
Dra. Débora Maria Tavares de Andrade (Autora);
Dra. Silvana Maria Elói Santos (Orientadora);
Dr. Pedro Guatimosim Vidigal. (Orientador).

Prezados Senhores,

O Comitê de Ética em Pesquisa do BIOCOR Hospital de Doenças Cardiovasculares Ltda. informa que, na reunião de 28 de janeiro passado, analisou e aprovou o Projeto intitulado "UTILIZAÇÃO DE UM ENSAIO LABORATORIAL QUANTITATIVO AUTOMATIZADO DE DOSAGEM DE BNP NA AVALIAÇÃO DE FUNÇÃO VENTRICULAR EM PACIENTES CHAGÁSICOS SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS", a ser realizado por V.Sas. como pesquisa para fins científicos e de aprimoramento profissional (Mestrado). Todavia, o início da referida investigação científica fica sujeito à prévia consulta e aprovação pela Comissão de Ética Médica do BIOCOR Hospital.

Atendidas as exigências pertinentes, fica estabelecido que todas as atividades relacionadas ao Estudo deverão ser previamente ajustadas com o Setor competente do BIOCOR Instituto e com a Dra. Érika Correa Vrandeic, representante indicada por este CEP, sempre sob a responsabilidade dos Pesquisadores que se comprometem a observar as normas éticas e a legislação em vigor sobre pesquisas, bem como a obter o consentimento do paciente e/ou familiares.

Nesta oportunidade, ficam renovados os votos de respeito e consideração.

Cordialmente,

Comitê de Ética em Pesquisa
Biocor Hospital de Doenças Cardiovasculares Ltda.

Termo de Consentimento

Informações Para Consentimento Para Participar Em Um Estudo de Pesquisa Clínica

Título: Utilização de um ensaio laboratorial quantitativo automatizado para avaliação de Insuficiência Cardíaca em pacientes Chagásicos sintomáticos e assintomáticos

Pesquisadores (ordem alfabética): Débora Maria Tavares de Andrade, Silvana Maria Elói Santos.

Introdução:

Antes de aceitar participar desta pesquisa clínica, é importante que você leia e compreenda a seguinte explicação sobre os procedimentos propostos. Esta declaração descreve o objetivo, procedimentos, benefícios, riscos, desconfortos e precauções do estudo. Também o seu direito de sair do estudo a qualquer momento. Nenhuma garantia ou promessa pode ser feita sobre os resultados do estudo.

Objetivo:

Quantificar o BNP em pacientes com Doença de Chagas (em fase crônica) sintomáticos e assintomáticos, avaliando-o como um marcador mais precoce do que o Ecocardiograma para disfunção ventricular esquerda.

Pesquisar valores de BNP obtidos por um método automático, utilizando técnica MEIA (enzimoimunoensio de micropartículas – Abbott) em pacientes chagásicos crônicos.

Avaliar o método automatizado quanto à reprodutibilidade dos resultados em amostras pariadas (amostras colhidas em diferentes dias).

Hipóteses a testar

Questões fundamentais a serem respondidas:

O método laboratorial automatizado tem boa reprodutibilidade?

O BNP seria mais precoce em detectar disfunção cardíaca do que o Ecocardiograma?

Existem diferenças significativas nas concentrações do BNP de acordo com a Classe funcional que se encontram os pacientes com insuficiência cardíaca?

O valor de referência para esse método automatizado coincide com os de outros ensaios não automatizados?

Resumo:

O BNP, peptídeo natriurético cerebral, é um neurohormônio sintetizado e liberado no sangue em resposta a sobrecarga de volume ou condições que causam a extensão do ventrículo, para controlar a homeostase de fluidos e eletrólitos interagindo com o sistema renina-angiotensina-aldosterona. As medidas dos níveis de BNP têm um elevado valor preditivo negativo (98%), sugerindo que pacientes com níveis de BNP normais, muito provavelmente, não apresentem disfunção ventricular. Portanto, o BNP tem sido considerado um bom marcador bioquímico para a triagem diagnóstica, avaliação do

tratamento e prognóstico de pacientes com insuficiência cardíaca congestiva (ICC) e largamente utilizado como marcador de morbidade e mortalidade em doenças cardíacas.

A ICC pode ser decorrente de múltiplas patologias, como, por exemplo, Infarto Agudo do Miocárdio (IAM), com perda importante da massa muscular cardíaca, e outras situações como as decorrentes de dilatação progressiva das câmaras cardíacas secundárias a sobrecarga de pressão, como na Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e Cardiopatia Chagásica. O paciente na fase crônica da Doença de Chagas pode ter como complicação da miocardiopatia dilatada decorrente da inflamação e destruição mioneural, insuficiência cardíaca em graus variados. O BNP nesses pacientes mostra evidências de piora da função ventricular e é tanto maior quantitativamente, quanto maior o grau de insuficiência cardíaca.

Com isso, torna-se importante o estudo do BNP em pacientes sintomáticos e assintomáticos na fase crônica da Doença de Chagas, pois trata-se de marcador laboratorial usado para esse fim.

Procedimentos:

Os pacientes incluídos no estudo serão os pacientes portadores de Doença de Chagas sendo caracterizados como: sintomáticos e assintomáticos, cadastrados no Centro de Treinamento e Referência em Doenças Infecto Parasitárias (CTR-DIP) da UFMG e nos estudos clínicos da prof. e pesquisadora Marta de Lanna.

A sua participação neste estudo constará apenas da coleta de amostra de sangue, por punção venosa através do sistema de coleta a vácuo (Vacuntainer, BD) em um frasco de 3ml, contendo o anticoagulante EDTA. O sangue coletado em EDTA será utilizado para a realização do ensaio BNP.

Os registros de sua participação serão mantidos confidencialmente até onde é permitido por lei. No entanto, o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG poderá verificar e ter acesso aos dados confidenciais que o identificam pelo nome. Qualquer publicação dos dados não o identificará. Ao assinar esse formulário de consentimento, você autoriza o pesquisador a fornecer os registros médicos para o Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.

Desligamento/Afastamento Médico:

A sua participação neste estudo é voluntária e sua recusa em participar ou seu desligamento do estudo não envolverá penalidades ou perda de benefícios que você tenha direito. Você poderá cessar sua participação a qualquer momento sem afetar seu acompanhamento médico em andamento.

Novas Descobertas:

Todos os novos achados descobertos durante a realização desta pesquisa que possam influenciar razoavelmente seu desejo de continuar a permitir sua participação neste estudo serão fornecidos a você assim que tais informações se tornarem disponíveis.

Compensação:

Você não receberá qualquer compensação financeira pela sua participação no estudo.

Emergência/Contato com a Comissão Ética:

Durante o estudo, se você tiver qualquer dúvida sobre este estudo por favor, contate o Comitê de Ética e Pesquisa-COEPE/UFMG, no telefone:

Consentimento:

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Estou assinando voluntariamente minha participação neste estudo.

Data: _____ / _____ / _____

Assinatura Responsável: _____