

Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso

PADRONIZACAO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA A
DETERMINACAO DA CONCENTRACAO DE FERRO EM
AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE HUMANOS



B0109083

U616.0756 L731p 2004 ex.1

CIDADE DE SANTO AMARO

PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE
HUMANOS

PATRICIA DA SILVA LINS

São Paulo
2004

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE
HUMANOS**

PATRICIA DA SILVA LINS

São Paulo

2004

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
MESTRADO EM ANÁLISES CLÍNICAS

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE
HUMANOS**

Dissertação apresentada como requisito
para a obtenção do título de Mestre em
Análises Clínicas sob a orientação da
Professora Dra. M^a Regina A. Azevedo e
co-orientação da Professora Dr^a Cibele
Bugno Zamboni.

São Paulo

2004

**Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Dr. Milton Soldani Afonso – Campus I**

L732p Lins, Patricia da Silva
Padronização de metodologia nuclear para a deter -
minação da concentração de ferro em amostras de san -
gue total de humanos / Patricia da Silva Lins. Orienta -
ção da Profa. Maria Regina Andrade Azevedo; coorienta -
ção da Profa. Cibele Bugno Zamboni. – São Paulo :
2004.
40p.

Dissertação (Mestrado). Área de Concentração em
Análises Clínicas. Universidade de Santo Amaro.

1. Ativação neutrônica 2. Ferro 3. Sangue I. Título

**PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA A DETERMINAÇÃO DA
CONCENTRAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL DE
HUMANOS**

Patrícia da Silva Lins

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientadora

1º Examinador

2º Examinador

Conceito Final: _____

São Paulo

2004

AGRADECIMENTOS

À minha família que está concluindo essa etapa junto comigo;

À minha orientadora Dr^a Maria Regina Andrade Azevedo pela preciosa oportunidade e simpatia com que sempre me recebeu;

À Dr^a Cibele pela dedicação dispensada e pela amizade;

Aos meus mestres Dr^a Celidéia, Dr Paulo, Dr^a Márcia Abel, Dr^a Maria Lúcia e Dr^a Carolina pela compreensão e carinho;

À Juliana, Elaine e Wellington por seus préstimos e atenção;

À UNISA que faz parte da minha vida desde a graduação;

Ao IPEN por viabilizar meu trabalho e

À UNIGRAN pelo apoio durante essa jornada.

Dedico

Com carinho para

Minha família,

João e Tereza,

Jacqueline, Thales e Isabella,

Paulo e Célia.

Aos amigos, especialmente

às amigas Solange Guimarães,

Fabiana Satake e Renata Volpe.

À Elisabeth Toral e Cibele Zamboni.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT.....	v
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVO.....	05
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	06
3.1 Ferro: características e importância biológica.....	06
3.2 Ferro e sua distribuição no corpo humano.....	08
3.3 Metabolismo do ferro.....	09
3.4 Metodologias disponíveis para determinação do ferro	13
3.4.1 Hemossiderina na medula óssea.....	13
3.4.2 Ferritina sérica.....	13
3.4.3 Ferro sérico.....	14
3.4.4 Saturação da transferrina.....	15
3.4.5 CTLF.....	15
3.4.6 Protoporfirina eritrocitária livre.....	16
3.4.7 Concentração da transferrina	17

3.4.8	Receptores da transferrina.....	17
3.4.9	Ativação Nuclear.....	18
4	CASUÍSTICA E MÉTODO.....	23
4.1	Tipo e População de Estudo.....	24
4.2	Obtenção dos Parâmetros Nucleares	24
4.3	Instrumentação Nuclear.....	26
4.4	Análise de Dados.....	27
4.5	Procedimento Experimental.....	28
4.5.1	Coleta e Preparo das Amostras.....	28
4.5.2	Padronização do tempo de irradiação e volume da amostra	29
5	RESULTADOS.....	30
6	DISCUSSÃO.....	34
7	CONCLUSÕES.....	37
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	38
	ANEXO I.....	vi
	ANEXO II.....	vii

LISTA DE FIGURAS

Figuras.....	Página
1) Espectro parcial de raios γ do sangue total (Beagle) ativado com nêutrons.....	20
2) Espectro parcial de raios γ do sangue total (Beagle) ativado com nêutrons.....	20
3) Composição Isotópica (em %) do ferro na natureza ..	20
4) Esquema simplificado do arranjo eletrônico utilizado.	20
5) Espectro comparativo obtido com a ativação da amostra de sangue total (500 μ l).....	32
6) Espectro comparativo obtido com a ativação da amostra de sangue total (500 μ l).....	32
7) Concentração de ferro em sangue total.	33
8) Fluxograma comparativo de determinação de ferro via metodologia convencional e metodologia nuclear.....	36

LISTA DE TABELAS

Tabela.....	Página
1) Composição isotópica do ferro na natureza, as reações nucleares possíveis com nêutrons e os raios γ emitidos.....	22
1) Síntese dos resultados obtidos referentes à irradiação das diferentes alíquotas de sangue total e soro, realizadas em diferentes tempos de irradiação, num fluxo de nêutrons da ordem de $\sim 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$	31

LISTA DE ABREVIATURAS

Z	número atômico
Fe	ferro
DMT1	“Divalent Metal Transporter”
H	“heavy”
L	“light”
IRE	“iron responsive elements”
IRP	“iron responsive proteins”
ST	saturação da transferrina
CTLF	capacidade total de ligação do ferro
TfR	receptor da transferrina
sTfR	receptor solúvel da transferrina
AAN	Análise por Ativação com Nêutrons
A	número de massa

RESUMO

O elemento ferro é integrante do metabolismo dos seres vivos e suas variações geralmente estão envolvidas em processos patológicos. A importância em quantificar o ferro no organismo reflete-se no número de métodos disponíveis no mercado, porém elas apresentam limitações como caráter invasivo de técnica como hemossiderina da medula óssea, interferências no caso de amostras hemolisadas, na presença de processos infecciosos e até contaminação do material utilizado no ensaio. Há também vantagens que asseguram uma quantificação mais precisa quando ocorre a combinação de técnicas como dosagem do ferro sérico, ferritina sérica e capacidade total de fixação do ferro, por exemplo. A técnica de ativação nuclear por nêutrons é mais uma alternativa para a determinação de ferro e oferece a quantificação do elemento em sangue total, reduzindo a manipulação da amostra, reduzindo os custos com o uso de reagentes e possibilitando reprodutibilidade do ensaio após o término de sua atividade residual de aproximadamente três meses, utilizando-se a mesma amostra.

Este trabalho se propôs a padronizar a quantidade e o tempo adequados para essa determinação.

Os resultados apontam para posterior estabelecimento dos valores de referência do elemento ferro em sangue total de humanos.

Palavras-chave: ferro, análise por ativação neutrônica, sangue

ABSTRACT

The element Iron takes part in the human being metabolism and its variations are generally related to pathological processes. The importance in quantifying Iron in the organism is reflected in the number of available methods; however they present limitations, such as the invasive character of bone marrow hemosiderine, interferences in hemolysed samples in presence of infectious processes and even the contamination of the material used in the assay. There are also advantages that assure a better quantification when a combination of techniques can be used, such as Serum Iron, serum Ferritin and a Total Iron Binding Capacity, for example. The Neutron Activation Analysis technique is another alternative for Iron determination in whole blood and it offers some advantages, such as cost and time reductions, because standards and reactants are not used; besides, this technique allows reexamination of the sample after the end of its radioactivity (3 months).

This work aimed to standardize the nuclear procedure for Iron determination in whole blood, establishing the appropriate conditions, such as the quantity of biological material to be collected, the irradiation time and the data analysis procedure.

The results show the necessity to determine the reference value for Iron in whole blood of human beings for clinical investigation.

Keywords: iron, Neutron Activation Analysis, whole blood

1 INTRODUÇÃO

Vários estudos destinam-se a elucidar o metabolismo do ferro e a sua determinação nos organismos vivos. Quase sempre as suas variações, excesso ou deficiência, estão associadas a algum tipo de patologia em curso (DEVLIN *et al.*, 1997).

De acordo com Tietz *et al.* (1998), o elemento ferro é imprescindível à vida, seja na composição de enzimas, ou na composição de proteínas transportadoras de gases, como a hemoglobina, graças à sua grande capacidade de “carrear” elétrons.

O ferro é absorvido através da dieta diária e não possui via fisiológica de excreção, o controle da quantidade de ferro corporal é regulado através da capacidade absorptiva deste elemento pelo organismo. Um mecanismo muito complexo está presente para absorvê-lo ou desprezá-lo conforme sua necessidade. Em casos de deficiência, a absorção do ferro é mais lenta ou inexistente, sendo desprezado juntamente com as células epiteliais no processo de descamação, evento este regulado geneticamente (ZAGO *et al.*, 2002).

Em casos de carência de ferro, as manifestações se tornarão evidentes somente quando o estoque orgânico estiver exaurido, então haverá o estabelecimento da anemia ferropriva.

A anemia ferropriva prevalece em 60% da população, principalmente crianças de 4 a 24 meses de idade, escolares, adolescentes do sexo feminino, gestantes e nutrizes e é um problema de saúde pública não só no Brasil, mas também em todo o mundo (YIP, 1992 apud QUEIROZ & TORRES, 2000).

Por outro lado, qualquer falha no complexo mecanismo regulador da absorção do ferro pode incorrer em um acúmulo desse elemento no organismo, não relacionado a uma administração prolongada de suplementos à base de ferro (TIETZ *et al.*, 1998), que é potencialmente danoso, pois se acumula em órgãos-alvo, como o fígado e o coração, caracterizando a hemocromatose, ou ainda, distúrbios na utilização do ferro pelos precursores eritróides, permanecendo na forma de depósito característico da anemia de doença crônica (CANÇADO & CHIATTONE, 2003).

Dada a importância da manutenção dos níveis de ferro, dentro da normalidade, deparamo-nos com vários parâmetros para sua determinação e também com algumas dificuldades em associar tais ferramentas às reservas corporais. Apesar dessa grande influência do ferro na eritropoese, a análise da série vermelha em esfregaços sanguíneos e índices hematimétricos não é muito útil para a determinação do ferro orgânico, pois as alterações características da deficiência (ou do acúmulo) de ferro aparecem somente quando já ocorreu a depleção dos estoques do organismo, tornando assim, necessária uma ferramenta auxiliar na detecção precoce dessas alterações, antes de instalada a anemia ou ocorrência de lesão de órgãos como no caso da hemocromatose.

São vários os ensaios para a quantificação do ferro em amostras biológicas, mas nenhum deles isoladamente é suficientemente sensível ou específico para

avaliar o *status* de ferro orgânico. Segundo Hastka *et al* (1996 apud NASCIMENTO *et al.*, 2001), "... o melhor marcador de ferro não existe. Entretanto, os diferentes testes complementam-se por detectar diferentes estágios e mostrar individualmente a extensão clínica da deficiência de ferro".

Muitos estudos vêm sendo realizados em busca de um parâmetro mais específico e sensível para a determinação do ferro, como a utilização dos receptores de transferrina por radioimunoensaio (KOHGO *et al.*, 1986 apud PAIVA *et al.*, 2000) ou por ensaio imunoenzimático (FLOWERS *et al.*, 1989 apud PAIVA *et al.*, 2000) e a utilização de ambos parâmetros com resultados livres de interferência em condições tais como a gestação ou processos infecciosos e inflamatórios.

Além da busca de maior sensibilidade e especificidade, atualmente há uma tendência para o desenvolvimento de técnicas diagnósticas menos invasivas. Por exemplo, há um equipamento no Brasil, ainda não disponível em escala comercial, o biossuscetômetro, capaz de medir a quantidade de ferro no organismo através da intensidade do campo magnético emitido por ele, cuja concentração maior localiza-se no fígado, dispensando recursos como a biópsia empregada até então para avaliação. Essa tendência pode ser observada em outros países como Estados Unidos, Alemanha e Itália, que também desenvolveram equipamentos com princípios semelhantes e com o mesmo objetivo de propiciar um diagnóstico mais seguro e preciso, com menor trauma ao paciente (ANTENOR, 2003).

Nesse sentido justifica-se a busca de métodos alternativos para quantificação de ferro em sangue. Com base nisto, o presente estudo é dedicado à avaliação do

uso de ferramentas nucleares para aplicação na área médica, mas especificamente, em Anatomia Patológica e Patologia Clínica.

Este estudo faz parte de um projeto multidisciplinar denominado "*Estudo da Distribuição de Metais em Amostras Biológicas via Metodologia Nuclear*", atualmente em desenvolvimento no IPEN em colaboração com a UNISA e Bancos de Sangue de várias regiões do Brasil, o qual tem por objetivo estabelecer as condições de otimização de parâmetros nucleares que possibilitem o uso da técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) como alternativa para a determinação de ferro em amostras de sangue total de forma eficiente e precisa. O uso dessa metodologia tem sido empregado, com sucesso, em análise de sangue total de animais de pequeno e médio porte (OLIVEIRA *et al.*, 2001, 2002, 2003, 2004; ZAMBONI *et al.*, 2000) simplificando etapas como manuseio e preparo da amostras, pois não necessita da separação do soro, além de fornecer uma análise qualitativa - quantitativa precisa de ferro em uma única análise.

A relevância deste estudo reside no fato de que o diagnóstico tradicional, para identificação do quadro anêmico, que abrange elevado percentual da população brasileira (YIP, 1992 apud QUEIROZ & TORRES, 2000), necessita de várias análises clínicas em soro, tais como, dosagem do ferro sérico, ferritina sérica e capacidade total de fixação do ferro, sendo para boa parte da população brasileira um processo oneroso, pois as técnicas atuais para a determinação de íons ferro em amostras de soro requerem equipamentos apropriados, padronização da coleta e conservação da amostra, fatores estes que elevam o custo e o tempo na determinação deste elemento.

2 OBJETIVO

Padronização do método nuclear para a determinação da concentração de ferro em amostras de sangue total de humanos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ferro: características e importância biológica

O elemento ferro pode ser conceituado tanto sob ponto de vista da Química ou da Física. Em Química, o elemento ferro é representado na Tabela Periódica pelo número atômico $Z=26$; seus íons mais comuns são o ferro ferroso (Fe^{2+}) e o ferro férrico (Fe^{3+}), utilizados para a análise quantitativa em ensaios biológicos. Na Física, particularmente a Física relacionada ao núcleo do átomo (Física Nuclear), o Fe é representado, por sua família isotópica, na tabela de núclídeos, isto é, por seu número de massa (soma do número de prótons e nêutrons que compõem seu núcleo) e sua análise quantitativa é feita a partir de suas propriedades nucleares.

A utilização do ferro é muito ampla e sua importância biológica é fundamental, pois está intimamente associada ao metabolismo dos seres vivos. Segundo Zago *et al.* (2002), "o ferro é componente de todos os organismos vivos..., entretanto, nem bactérias nem células eucariotas são capazes de se proliferar na sua ausência ..." A exemplo disso foi realizado trabalho com cepas de enterobactérias (7 sorotipos de

EIEC) e confirmou-se que estas bactérias utilizam ferro de fontes diversas como hemina, hematina, hemoglobina, ovotransferrina, transferrina, lactoferrina e ferritina (AGNOLL & MARTINEZ, 1999).

Ainda, de acordo com Devlin *et al.* (1997), a afinidade do ferro por átomos eletronegativos permite uma troca de elétrons com o oxigênio. Por isso, "o ferro está intimamente envolvido no metabolismo do oxigênio...".

Segundo Tietz *et al.* (1998) "o organismo controla de modo rigoroso sua reserva de ferro". ou seja, uma vez incorporado no corpo humano "tem-se a inexistência de uma via de excreção fisiológica".

O ferro também está presente no leite materno ligado a lactoferrina, uma glicoproteína semelhante a transferrina. A função da lactoferrina está associada à sua capacidade antimicrobiana de forma a proteger o lactente de infecções intestinais, pois os microorganismos necessitam de ferro para sua replicação e função. Mas, a lactoferrina também é componente dos granulócitos a qual é liberada na presença de infecções, portanto encontra-se presente nas secreções mucosas e, segundo Devlin *et al.* (1997), além de sua função bacteriostática atua também como transportadora e armazenadora de ferro no leite materno.

Segundo Lynch (1997 apud MARTINI, 2002), o ferro está amplamente distribuído em alimentos. Alguns tecidos animais contêm ferro na forma heme, ferritina e hemossiderina. Particularmente, ovos e laticínios podem conter proteínas específicas como a lactoferrina e a ovotransferrina. Já nos vegetais o ferro encontra-se na forma de metaloproteínas, planta ferritina e ferro complexado com componentes estruturais. O ferro pode estar presente também nos alimentos como

um contaminante inorgânico, ou ainda, na forma de compostos de ferro adicionados durante o processamento com o objetivo de fortificação da dieta.

3.2 Ferro e sua distribuição no corpo humano

O ferro está distribuído no corpo humano na hemoglobina, em sua forma ferro-heme e em outros tecidos, na forma de ferritina ou de hemossiderina.

Segundo Zago *et al* (2001), mais de 2/3 do conteúdo de ferro orgânico encontra-se na molécula de hemoglobina. Uma hemácia contém bilhões de átomos de ferro e esta concentração corresponde à incorporação de 2×10^{20} átomos de ferro por dia. Por esse motivo a anemia é um sinal preponderante da carência de ferro. O restante do ferro está armazenado, predominantemente, na forma de ferritina no fígado e baço, e uma pequena quantidade na mioglobina, em células dos músculos esqueléticos e cardíaco.

O ferro participa de várias funções importantes no metabolismo dos seres vivos devido à sua capacidade de conduzir elétrons, facilitando reações químicas, através de sua condição iônica de ferro férrico (Fe^{3+}) e ferro ferroso (Fe^{2+}). Portanto, em sua forma iônica ele pode apresentar-se associado tanto ao grupo heme, como na hemoglobina e mioglobina, ou ainda na forma sulfúrea presente em algumas enzimas, como a ribonucleotídeo-redutase. Quando armazenado, o ferro assume a forma de ferritina ou hemossiderina (DEVLIN *et al.*, 1997).

3.3 Metabolismo do ferro

A absorção do ferro é regulada de maneira complexa e rigorosa, pois não há outro meio fisiológico de excretá-lo uma vez absorvido. Sua absorção acontece nas vilosidades das células intestinais do duodeno e do jejuno, com maior eficiência de absorção na forma heme, cujo mecanismo ainda não está totalmente esclarecido seguido pelas formas Fe^{2+} e Fe^{3+} , respectivamente (DEVLIN *et al.*, 1997).

No intestino delgado, o ferro em sua forma heme, ou ferro porfirina intacto é solúvel, o que facilita a sua absorção. Posteriormente, ele é liberado pelo enterócito por ação da enzima heme-oxigenase e segue para o plasma, onde será transportado da mesma forma que o ferro inorgânico, para integrar a eritropoese ou para armazenamento (ZAGO *et al.*, 2002).

O ferro inorgânico em pH neutro e alcalino, quando em soluções aquosas, favorece o estado de ferro férrico e quando em pH ácido favorece a forma de ferro ferroso. Assim, o ferro férrico sofre ação do pH gástrico reduzido, é estabilizado e liga-se à mucina, para posterior conversão a ferro ferroso por processo enzimático. Já nas vilosidades das células intestinais ele necessita romper duas membranas, a membrana apical e a membrana basolateral, até chegar ao plasma. Neste caminho necessita de ajuda de um transportador, o DMT1 ("Divalent Metal Transporter 1"), que permite a internalização do ferro no enterócito. A afinidade do DMT1 ao ferro torna-se limitada à medida que houver outros metais ali presentes, pois também têm afinidade ao transportador os íons como o cobre, o zinco e o manganês. (ZAGO *et al.*, 2002).

Após sua internalização na célula da mucosa intestinal, o ferro pode ficar armazenado sob forma de ferritina ou atravessar a membrana basolateral e alcançar o plasma, dependendo da necessidade orgânica, ou seja, quando há muita oferta de ferro na dieta e a quantidade de ferritina é abundante no enterócito, a absorção é bloqueada e o mecanismo é chamado de bloqueio mucoso, bastante eficiente em casos de dieta com excesso de ferro, mas ineficiente na presença de algumas drogas que suplantam esse bloqueio (ZAGO *et al.*, 2002).

A ferritina é uma molécula hidrossolúvel e compõe-se de um centro de cristal de óxido férrico nonidratado encerrado num arcabouço de apoferritina, esta por sua vez, compõe-se de unidades que formam um dodecaedro, que podem ser do tipo H (do inglês, *heavy*) e L (do inglês, *light*). Essa distinção é importante porque é ela que vai determinar a afinidade da apoferritina pelo ferro. Por exemplo, a apoferritina cujas unidades tipo H são mais abundantes, tem maior avidez pelo ferro, mas não o mantém por muito tempo, enquanto a apoferritina cujas unidades são L apresenta menor avidez, mas mantém o ferro de maneira mais estável. Deste modo, torna-se possível entender porque as reservas de ferro presentes no fígado e no baço estão em maior parte como ferritina de forma L e no plasma uma maior quantidade na forma H, pois estas últimas são facilmente mobilizáveis, de acordo com a necessidade orgânica.

A hemossiderina é uma molécula hidrófoba presente em macrófagos e monócitos da medula óssea, fígado e baço, é um centro de cristal de óxido férrico hidratado desprovido da apoferritina (ZAGO *et al.*, 2002).

Um segundo mecanismo regula o estoque de ferro, de modo que o excesso deste no organismo leva a uma redução da absorção pelo enterócito e, em contraponto, sua deficiência leva a uma maior avidéz absortiva, através do transportador transmembrana - DMT1. Esse controle é regido por estruturas presentes no RNA mensageiro denominadas IREs (do inglês, "*iron responsive elements*"), porém, não se trata de um mecanismo exclusivo do DMT1, mas envolve também outras proteínas como a transferrina e seu receptor, a ferritina e enzimas correlatas. Na elevação dos níveis de ferro a enzima IRP ("*iron responsive proteins*") aconitase citoplasmática, liga-se ao ferro deixando seus sítios IREs "ociosos", enquanto que em baixas concentrações de ferro, os sítios IRPs estão disponíveis para ligação com os IREs, de modo que a ligação da IRP ao IRE irá reduzir a tradução do RNA. Por outro lado, quando a IRE está presente na porção 3' não traduzida do RNA, a ligação entre IRPs aos IREs estabiliza a molécula do RNA favorecendo a sua tradução (ZAGO *et al.*, 2002).

O terceiro mecanismo regulador é denominado regulador hematopoiético que é um controle que atende às necessidades da eritropoese e cujo mecanismo não está ainda totalmente esclarecido.

O destino do ferro, logo após ter saído do enterócito é seguir pelo plasma até a medula óssea e participar da eritropoese, ou seguir para depósitos no fígado, rins e baço, ou ainda participar dos músculos, na forma de mioglobina, ou na composição de enzimas e citocromos.

De modo geral, o ferro quando é admitido no organismo desempenhará papel importante onde for necessário e participará ativamente da composição de novas hemácias e de outras proteínas.

A utilização dos estoques de ferro acontece de acordo com a necessidade metabólica e envolve a redução do ferro férrico para ferro ferroso, liberação do cristal de óxido de férrico, sua distribuição pelo citoplasma até ser reoxidado na membrana pela hefestina, uma proteína transmembrana, ou no meio extracelular pela ceruplasmina, enzima sérica envolvida na conversão do ferro em férrico e ferroso, também conhecida como ferroxidase I (ZAGO *et al.*, 2002; COOK *et al.*, 1979 apud PAIVA *et al.*, 2000).

A transferrina e a lactoferrina são glicoproteínas sintetizadas pelo fígado e têm como função transportar ferro no plasma e no leite materno, respectivamente. Em indivíduos normais, praticamente todo o ferro plasmático é transportado na forma associada a transferrina e segue, em sua maior parte, para a medula óssea, onde há grande número de receptores que levam esse elemento até as mitocôndrias, onde será associado a protoporfirina na formação da hemoglobina que irá compor as hemácias, desempenhando papel no transporte de gases e cuja vida é curta, comprometendo a reutilização do ferro de forma cíclica (ZAGO *et al.*, 2002).

Em todo esse processo não se observa excreção do ferro, porém uma parte inevitavelmente é desprezada ou perdida. Inicialmente quando a capacidade absorptiva do enterócito é reduzida, parte do ferro presente na dieta não chega a ser absorvido, ou de outro modo, pela própria descamação das células intestinais contendo o ferro na forma de ferritina ou em pequenas perdas decorrentes da

descamação uretral, cujo conteúdo de ferro, embora pequeno, é perdido. Condições como menstruação e doação de sangue são importantes perdas de ferro, pois a maior parte dele se concentra na hemoglobina presente nas hemácias (ZAGO *et al.*, 2002).

3.4 Metodologias Disponíveis para a Determinação do Ferro

3.4.1 Hemossiderina na medula óssea

O parâmetro laboratorial considerado como “padrão ouro” para avaliação do *status* de ferro no organismo constitui a pesquisa de *in vitro* de hemossiderina na medula óssea, com reação química do azul-da-prússia. A hemossiderina é uma molécula hidrófoba que consiste numa das formas de armazenamento do ferro, presente em grande parte em macrófagos e monócitos da medula óssea, fígado e baço. A ausência da hemossiderina na medula óssea é indicativa de depleção do ferro orgânico, mas apesar de conclusivo, é um método impróprio para triagem pelo seu caráter invasivo (COOK *et al.*, 1979 apud PAIVA *et al.*, 2000). Além disso, o corte do coágulo medular é mais recomendado do que o aspirado da medula óssea, as amostras ainda têm que ser descalcificadas e os agentes utilizados nesse processo podem destruir certa quantidade de ferro (RAVEL, 1995).

3.4.2 Ferritina sérica

Outro parâmetro muito utilizado é a determinação da ferritina sérica, útil para uma estimativa das reservas orgânicas de ferro devido à sua estreita relação com as reservas de ferro depositadas em diferentes tecidos. Apesar dessa sensibilidade e correlação com os estoques corporais, a ferritina sérica sofre interferência de infecções crônicas, distúrbios inflamatórios e neoplasias e sendo assim, é um parâmetro importante na ausência de patologias concomitantes ou até mesmo em condições fisiológicas como gravidez e infância, o que vem dificultar o

estabelecimento de um ponto de corte plausível para a avaliação do *status* de ferro corporal. A dosagem da ferritina no soro pode ser realizada por muitos métodos, como ensaio imunoradiométrico, ensaio imunoenzimático e ainda quimiluminescência. Cada ensaio, porém, apresenta variações importantes nessas medidas (GUERRA-SHINOHARA, 2000).

3.4.3 Ferro sérico

A determinação do ferro sérico é uma ferramenta muito utilizada pelos laboratórios, pois é um parâmetro bastante sensível quando as reservas corporais do ferro já estão esgotadas. Mas, é um parâmetro também passível de interferências quando há processos infecciosos (COOK *et al.*, 1979 apud PAIVA *et al.*, 2000), gestação (1º trimestre da gravidez) e também de acordo com a concentração de ferritina na amostra (concentrações superiores a 100µg/L), provavelmente devido à liberação do ferro da ferritina sérica pelo baixo pH da mistura da reação e do tratamento da desnaturação da proteína por precipitação com HCL e ác. tricloroacético (TIETZ *et al.*, 2000). A determinação do ferro sérico reflete predominantemente o ferro ligado às proteínas séricas, maior parte ligado à transferrina, assim os níveis de ferro sérico dependem não só da quantidade de ferro disponível como também da quantidade de transferrina presente. Outro fator é o comportamento do ferro sérico durante o decorrer do dia, cuja oscilação é estimada entre 20 – 30% e o pico ocorre normalmente no período da manhã (RAVEL, 1995).

O princípio do método de dosagem do ferro sérico baseia-se na liberação do ferro férrico ligado a transferrina em condição de pH do soro reduzido, havendo uma

conversão do ferro férrico (Fe^{3+}) para ferro ferroso (Fe^{2+}), que será complexado a um cromógeno de elevada absorvância, a batofenantrolina e a ferrozina, para que posteriormente seja efetuada a leitura espectrofotométrica.

3.4.4 Capacidade total de ligação do ferro (CTLF)

Paralelo à dosagem de ferro sérico tem-se ainda outro parâmetro chamado de capacidade total de ligação do ferro (CTLF) ou TIBC (“total iron-binding capacity”) que consiste na medida da concentração máxima de ferro que as proteínas do soro podem transportar, ou seja, é uma estimativa aproximada da transferrina sérica (RAVEL, 1995). Seu comportamento é útil na identificação de um quadro ferropênico, quando ocorre um aumento deste parâmetro indica um maior transporte de ferro. Por outro lado, situações nas quais há inflamação, este parâmetro encontra-se reduzido. Há outras situações ainda, em que inflamação e ferropenia estão presentes e este parâmetro encontra-se normal, o que o torna menos fidedigno.

A capacidade total de ligação ao ferro é determinada pela adição de ferro férrico, na amostra de soro, em quantidade suficiente para saturar os sítios de ligação da transferrina; em seguida, o excesso de ferro é removido (por adsorção com pó fino de carbonato de magnésio, por exemplo) para posterior realização de novo teste, para mensurar a quantidade de ferro restante. Portanto, a determinação da capacidade total de ligação do ferro também apresenta limitações em razão de basear-se em dois outros parâmetros com especificidades limitadas (TIETZ, 1998).

3.4.5 Saturação da transferrina

A partir da relação entre a dosagem de ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro, obtém-se a saturação da transferrina (ST), calculada a partir da seguinte expressão:

Saturação da transferrina (%) = 100 x ferro na capacidade total de ligação de ferro do soro (TIETZ, 1998).

É um método mais sensível do que a determinação do ferro sérico e a capacidade total de fixação do ferro na determinação de deficiência crônica de ferro, pois quando ocorre queda na quantidade de ferro sérico, há um aumento na CTLF que implica numa queda da ST(%).

3.4.6 Protoporfirina eritrocitária livre

A protoporfirina eritrocitária livre é mais um parâmetro utilizado para a avaliação do ferro, pois em casos de deficiência, a protoporfirina encontra-se “ociosa” nos eritrócitos, o que não ocorreria com uma oferta normal de ferro, condição na qual a protoporfirina estaria compondo a hemoglobina juntamente com o ferro.

O método empregado para sua avaliação consiste na determinação da protoporfirina a partir do complexo formado com o zinco (complexo zinco – protoporfirina) utilizando equipamentos que mensuram a sua fluorescência. Este método, porém, está sujeito a alterações em casos de intoxicação, de problemas renais ou quando existe uso de certas drogas e não é significativo em casos de

excesso de ferro (TIETZ, 1998): Estudos recentes sugerem que a importância da protoporfirina na participação na degradação do heme até bilirrubina, bem como na modulação da degradação do heme, é indiscutível, porém sua utilização como ferramenta para estados ferropênicos e intoxicações por chumbo ainda requer estudos mais aprofundados (LABBE *et al.*, 2000).

3.4.7 Concentração da transferrina

A concentração de transferrina no soro ou transferrina sérica também pode ser obtida através de imunoenaios e relaciona-se com a capacidade total de fixação ao ferro:

Transferrina no soro (g/l) = 0,007 x Capacidade total de fixação ao ferro
(TIETZ, 1998).

Mas esta relação pode ser tendenciosa, por não levar em conta uma quantidade, ainda que pequena, de ferro no soro ligado a outras proteínas.

3.4.8 Receptores da transferrina

O receptor da transferrina (TfR) é uma proteína transmembrana e sua expressão na membrana celular é proporcional à necessidade orgânica de ferro. Em sua forma solúvel (sTfR), é útil como parâmetro da avaliação do ferro e da atividade da eritropoese. Segundo Lorenzo *et al* (2001) e Richardson *et al* (2001), há uma relação de proporcionalidade entre a concentração circulante de sTfR e a concentração total de TfR celular, assim a quantidade de sTfR é proporcional à

massa do precursor eritróide e correlaciona-se inversamente à quantidade de ferro no organismo. Quando ocorre uma redução dos níveis de ferro orgânico, tem-se um aumento na quantidade de receptores da transferrina, assim como o aumento na atividade eritropoética está associado a maior absorção gastrointestinal de ferro e elevação do número de receptores da transferrina.

Algumas células, como reticulócitos imaturos, possuem alta concentração de receptores de transferrina em sua membrana, sendo, portanto utilizadas para a realização de medidas do receptor da transferrina solúvel (sTfR) (BEGUIN, 1992 apud LIMA & GROTTTO, 2003).

3.4.9 Metodologia de Ativação Nuclear para a determinação de ferro total

O método nuclear, denominado Análise por Ativação com Nêutrons (AAN), lança mão de um bombardeio de nêutrons na amostra de sangue, a partir de um reator nuclear, que induz reações nucleares nos núcleos dos elementos presentes e cada um deles ao tornar-se radioativo, emitirá radiações γ característica (E_γ), processo este denominado desexcitação nuclear. Já existe tabela padronizada, a Tabela de Nuclídeos, identificando a energia contida na emissão dessas radiações γ e sua respectiva meia – vida ($T_{1/2}$), isto é, o tempo necessário para que a emissão das radiações γ reduza-se à metade, facilitando assim a identificação de cada elemento radioativo e desprezando sua condição iônica, já que a desexcitação será medida a partir de radiações γ emitidas pelo núcleo radioativo, independente de sua eletrosfera.

O sangue possui vários elementos que podem ser mensurados a partir desse método, como o cloro, o potássio e o sódio, por exemplo, (ver Figuras 1 e 2), cada um deles emitindo radiação γ com energia e meia vida características que os identifica. No caso do ferro, em particular, são utilizadas as radiações de 1099 keV e/ou 1291keV para sua identificação e quantificação.

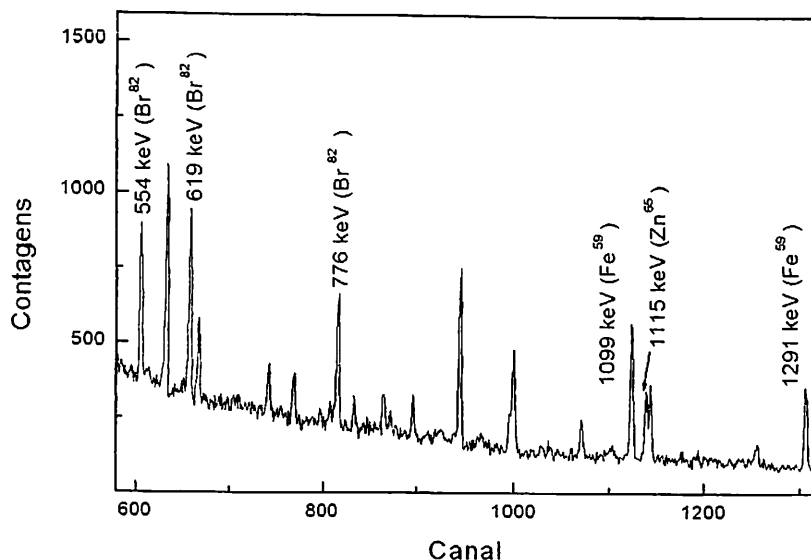


Figura 1. Espectro parcial de raios γ do sangue total (Beagle) ativado com nêutrons. Os raios γ não identificados dizem respeito às energias das radiações que compõem a radiação de fundo do laboratório (Oliveira, 2003).

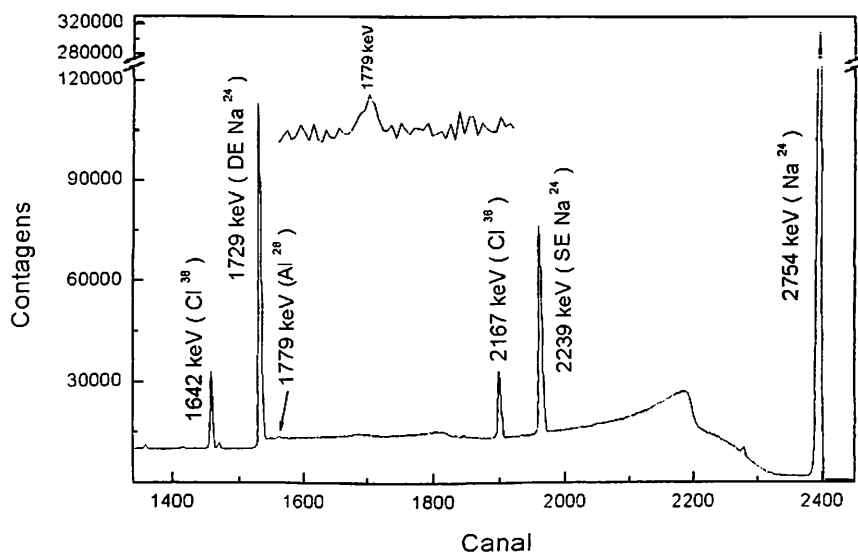


Figura 2. Espectro parcial de raios γ do sangue total (Beagle) ativado com nêutrons, onde: SE e DE são Simples e Duplo Escape da radiação- γ (Oliveira, 2003).

A composição isotópica é o conjunto de formas que um elemento químico pode se apresentar na natureza, sob aspecto de sua condição nuclear, ou seja, sua condição isotópica, que significa dizer que o núcleo do átomo de ferro encontra-se na natureza com diferentes números de massa (A), porém conservando sua identidade química. Para ilustrar, a Figura 3 apresenta a composição dos isótopos de ferro na natureza e conforme Tabela 1 algumas de suas propriedades nucleares, relacionadas a seus isótopos, que permitem sua quantificação via metodologia nuclear (AAN).

Composição isotópica do ferro

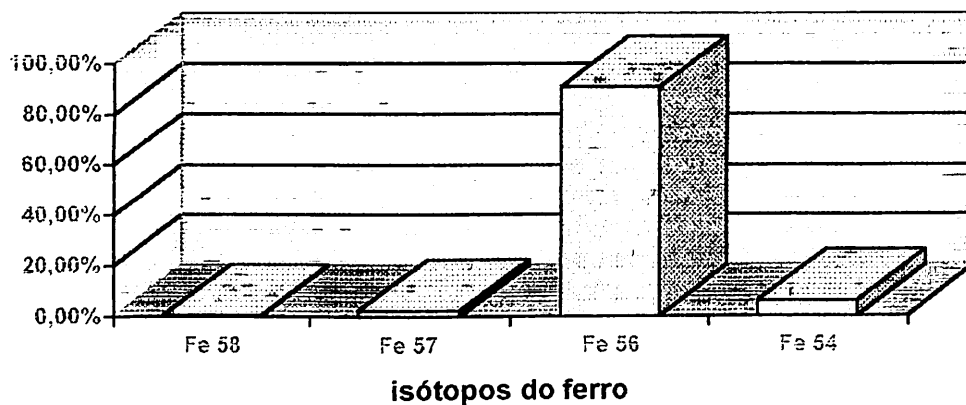


Figura 3. Composição Isotópica (em %) do ferro na natureza (Oliveira, 2003).

Tabela 1. Composição isotópica do ferro na natureza, as reações nucleares possíveis com nêutrons e os raios γ emitidos.

Composição Isotópica de Fe (%)	Isótopos Fe ^A	Reação Nuclear NA (n, γ)NP \rightarrow (T _{1/2})	Energia do raio γ (E _{γ}) emitido por NP (keV)
5,9	Fe ⁵⁴	Fe ⁵⁴ (n, γ) Fe ⁵⁵ \rightarrow (2,7 anos)	não emite raios γ
91,7	Fe ⁵⁶	Fe ⁵⁶ (n, γ) Fe ⁵⁷	estável*
2,1	Fe ⁵⁷	Fe ⁵⁷ (n, γ) Fe ⁵⁸	estável*
0,28	Fe ⁵⁸	Fe ⁵⁸ (n, γ) Fe ⁵⁹ \rightarrow (44 dias)	1099, 1291

A : é nº de massa

NA : núcleo alvo (sangue)

NP: núcleo produzido após o bombardeio com nêutrons (sangue radioativo)

T_{1/2}: meia vida (tempo necessário para que a taxa de emissão de raios γ decaiam a metade)

* não há formação de núcleo radioativo

Como se pode observar na Tabela 1, somente o ferro na forma de Fe⁵⁸, que representa 0,28% da composição total de ferro na natureza, é passível de quantificação pelo método nuclear, via Fe⁵⁹, que é radioativo.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Tipo e População de Estudo

Para a padronização da análise do sangue, via metodologia nuclear, foram coletadas amostras de sangue total de doadores voluntários do Banco de Sangue Paulista, mediante autorização por escrito no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a respeito do trabalho em desenvolvimento (anexo I), conforme padrões éticos para trabalho envolvendo seres humanos.

A população escolhida para o estudo foi a de doadores de sangue, cujo perfil atende um padrão previsto em legislação própria, com faixa etária definida, bem como valores de hemoglobina, pressão arterial, ausência de febre e sorologia negativa para doenças infecto-contagiosas. Esses fatores foram considerados importantes numa tentativa de minimizar situações como processos infecciosos, anemias ou doenças crônicas que interferem nos valores normais do ferro sérico, já que excluí-los ainda não é possível pelos parâmetros estabelecidos na legislação vigente.

4.2 Metodologia Nuclear

4.2.1 Obtenção dos parâmetros nucleares

O método nuclear consiste em irradiar pequenas quantidades de material biológico (amostras de sangue) com nêutrons no Reator IEA-R1 (IPEN) e analisar a radiação γ induzida após a ativação nuclear. O uso da técnica de ativação com nêutrons fornece informações quali - quantitativa dos materiais ativados, no caso em estudo, o sangue humano. Mas, para a utilização deste método de análise é necessário o conhecimento do fluxo de nêutrons. Particularmente, para determinação de fluxo de nêutrons em reator térmico emprega-se a técnica da Razão de Cádmiio (MUECK; BENSCH, 1993, Cadmium correction factors of several thermal neutron foil detectors). A utilização deste procedimento permite a determinação do fluxo pela expressão:

$$\phi n = A^{Au} \cdot M (1 - F_{cd} / R_{cd}) / m \cdot N_A \cdot \sigma \cdot kt \quad [eq.1]$$

onde:

ϕn fluxo de nêutrons

A^{Au} atividade de saturação do detetor de ativação (folha de Ouro)

M peso atômico do ouro (Au)

N_A número de Avogadro

m massa da amostra de ouro

F_{cd} fator de Cádmiio, tabelado na referência (MUECK & BENSCH, 1973)

R_{cd} a razão obtida experimentalmente pela irradiação das folhas de Ouro (nua e coberta com Cádmiio).

σ seção de choque de ativação (tabelado)

kt fator de perturbação do fluxo, tabelado na referência (MESTINICK, 1978; MCLEROY *et al.*, 1967)

A medida da atividade pode ser obtida por um sistema de contagem conhecendo-se a eficiência de detecção da transição γ de interesse usando a expressão:

$$A = C_{\gamma} \cdot \lambda / \epsilon_{\gamma} \cdot I_{\gamma} \cdot (1 - e^{-\lambda T_i}) \cdot e^{-\lambda T_e} \cdot (1 - e^{-\lambda T_c}) \quad [\text{eq. 2}]$$

onde:

A atividade do isótopo

C_{γ} área da transição gama discriminada, obtida pelo programa de ajuste IDF (GOFFON, 1987)

λ constante de desintegração (tabelado)

ϵ_{γ} eficiência de detecção na energia da transição gama discriminada (medida experimentalmente)

I_{γ} intensidade da transição gama discriminada (tabelada)

T_i tempo de irradiação (estabelecido)

T_e tempo de espera (intervalo de tempo que decorre entre o final da irradiação e o início da contagem)

T_c tempo de contagem (estabelecido)

Desta forma, obtém-se a concentração de ferro ativado, nas amostras biológicas em questão.

4.3 Instrumentação Nuclear

A instrumentação nuclear utilizada na aquisição dos espectros em energia da radiação γ constitui-se de um espectrômetro- γ , um sistema eletrônico e um sistema de aquisição de dados descritos a seguir.

O espectrômetro- γ é constituído por um detetor semiconductor de Germanio hiperpuro montado no interior de uma blindagem de chumbo. Este tipo de blindagem

é necessária para minimizar a radiação de fundo do laboratório. Um suporte circular de lucite, centralizado sobre a face do detetor, sustenta a amostra de sangue.

O sistema de aquisição de dados consiste de um detetor para medida de radiação γ , fonte de alimentação e um multicanal ADCAM, (ORTEC-918-A) controlado por um microcomputador padrão PC-486.

Na figura 4 é apresentado um diagrama ilustrativo do instrumental utilizado.

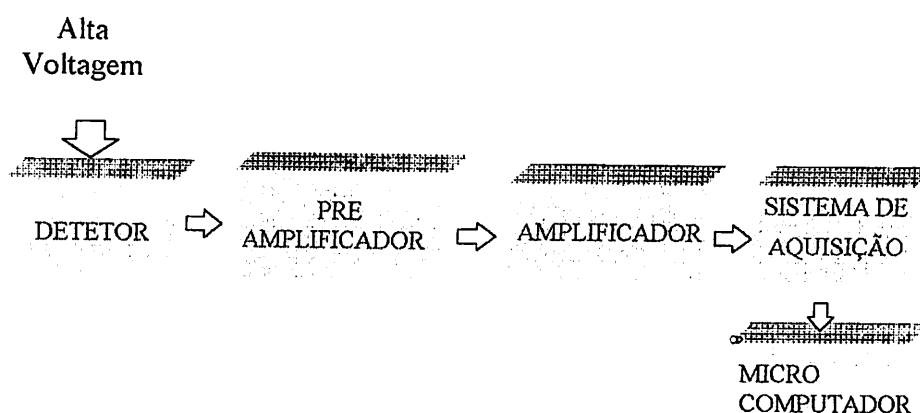


Figura 4: Esquema simplificado do arranjo eletrônico utilizado.

4.4 Análise de dados

Cada amostra biológica de sangue, juntamente com as amostras de ouro, (nua e com Cd), são irradiadas no reator IEA-R1, permitindo a ativação simultânea destes materiais. Desta forma obtém-se os espectros de raios γ tanto para o cálculo do fluxo de nêutrons bem como para a obtenção da concentração do elemento ferro ativado, nas mesmas condições de irradiação.

Após a irradiação, as amostras de ouro são submetidas à contagem, no espectrômetro de raios γ , permitindo a identificação e cálculo da área da transição gama de 411keV do ^{197}Au para determinação do fluxo de nêutrons. Da mesma forma, cada amostra biológica será também submetida à contagem no espectrômetro- γ , permitindo a identificação e cálculo das áreas das transições γ de interesse no Ferro que correspondem as energias de 1099 e 1291 keV. Esses espectros de raios γ são analisados utilizando-se o programa IDF (GOFFON, 1987).

De posse da curva de eficiência do espectrômetro- γ , do valor do fluxo de nêutrons, da área da transição γ de interesse, obtém-se a concentração de elemento Ferro nas amostras de sangue utilizando um software desenvolvido por Medeiros (2002).

4.5 Procedimento Experimental

O procedimento consistiu em coletar e irradiar sangue com nêutrons, no Reator IEA-R1 do IPEN, estabelecendo as condições de otimização para obtenção da concentração de ferro em sangue. Os parâmetros avaliados foram a quantidade de sangue, tempo de irradiação e tempo de contagem da radiação gama emitida pelo Ferro.

4.5.1 Coleta e Preparo das Amostras

Para o desenvolvimento desta parametrização foram colhidos aproximadamente 2 ml de sangue total de doadores voluntários do Banco de Sangue Paulista, na ausência de qualquer tipo de anticoagulante (tubo seco). Imediatamente após a coleta, parte do sangue total foi transferido para cilindros plásticos, apropriados para coleta de material biológico (ependorf), antes da coagulação. O sangue restante, no tubo de coleta, era então centrifugado a 3.000rpm, durante 10 minutos, para a obtenção do soro. Da mesma forma, as amostras de soro foram acondicionadas nos cilindros plásticos. Foram preparadas amostras de diferentes alíquotas (100, 300 e 500 μ l), em duplicata sempre que possível (em função da coagulação, nem sempre foi possível colher sangue total em duplicata para diferentes alíquotas), tanto de sangue total como soro de cada doador. Portanto de cada doador foram preparadas 6 amostras de sangue total (duas de 100 μ l; duas de 300 μ l; duas de 500 μ l) e 6 de soro (nas mesmas alíquotas).

4.5.2 Padronização do método nuclear

Para padronização do método foram analisadas as diferentes alíquotas de sangue total e soro em relação ao tempo de irradiação. Cada amostra foi analisada após 30', 60', 120' e 480' de irradiação.

Uma vez estabelecida a quantidade de sangue e o tempo de irradiação para ativação do ferro, a etapa seguinte consistiu em estabelecer o tempo de contagem da radiação emitida pelo ferro radioativo (Fe^{58}), para as medidas efetuadas no espectrômetro de raios gama, descrito na seção 4.3 (instrumentação nuclear).

5 RESULTADOS

No presente estudo foram irradiadas amostras de sangue total e de seu soro, de diferentes alíquotas (100, 300 e 500 μ l), para obtenção dos parâmetros que permitam a ativação do isótopo de Fe ⁵⁸ de forma otimizada.

Na Tabela 2 é apresentado um quadro que sintetiza os resultados obtidos nos ensaios realizados via metodologia nuclear e nas Figuras 5 e 6 são apresentados os espectros comparativos de raios gama de uma das amostras em função do tempo de irradiação.

Tabela 2. Síntese dos resultados obtidos referentes à irradiação das diferentes alíquotas de sangue total e soro, realizadas em diferentes tempos de irradiação, num fluxo de nêutrons da ordem de $\sim 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$.

Alíquotas MB (μl)	n	Tempo de Irradiação (minutos)			
		30	60	120	480
100 ST	8	na	na	na	na
100 S	8	na	na	na	na
300ST	4	aND	aND	aND	aND
300S	4	na	na	na	na
500 ST	8	a	a	a	a
500 S	4	na	na	na	aND

ST: sangue Total

S : soro

n: número de amostras irradiadas

na : não ativado

aND: ativado mas Não Determinado em função da baixa estatística de contagem.

a: ativado e possível de determinação

MB: material biológico

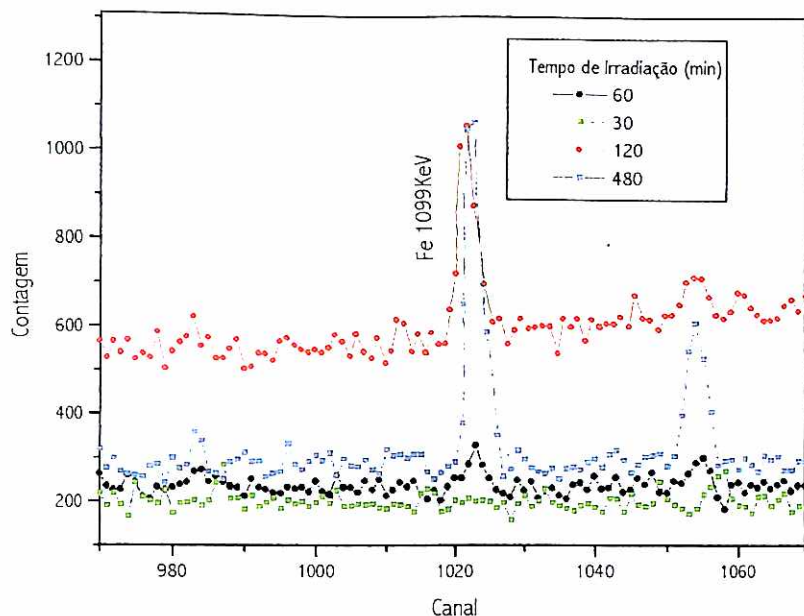


Figura 5: Espectro comparativo obtido com a ativação da amostra de sangue total (500µl). Em destaque a energia de 1091keV do Fe⁵⁹.

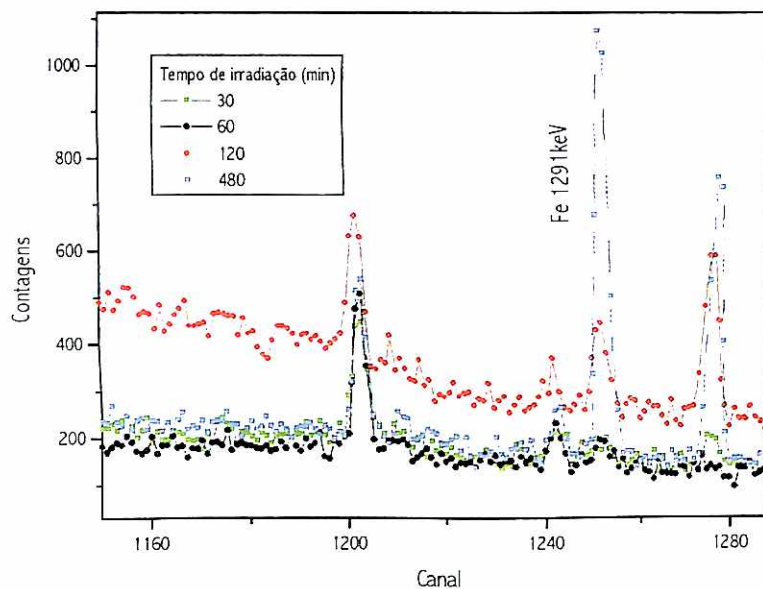


Figura 6: Espectro comparativo obtido com a ativação da amostra de sangue total (500µl). Em destaque a energia de 1291keV do Fe⁵⁹.

De acordo com a Tabela 2 foi possível estabelecer as condições de otimização do método para alíquotas de 500 μ l de sangue total, tempo de irradiação de 120 minutos e 1 hora de contagem. Para ilustrar, na Figura 7 é apresentado o resultado obtido para concentração de ferro para as condições pré-estabelecidas. Embora a ativação do sangue tenha sido obtida em 30 minutos de irradiação, o erro associado à irradiação de 2 horas (~9%) é significativamente menor, comparativamente as irradiações de 30 (~31%) e 60 (~24%) minutos, apesar da irradiação de 8 horas apresentar menor erro (~5%), mas inviabilizar o processo.

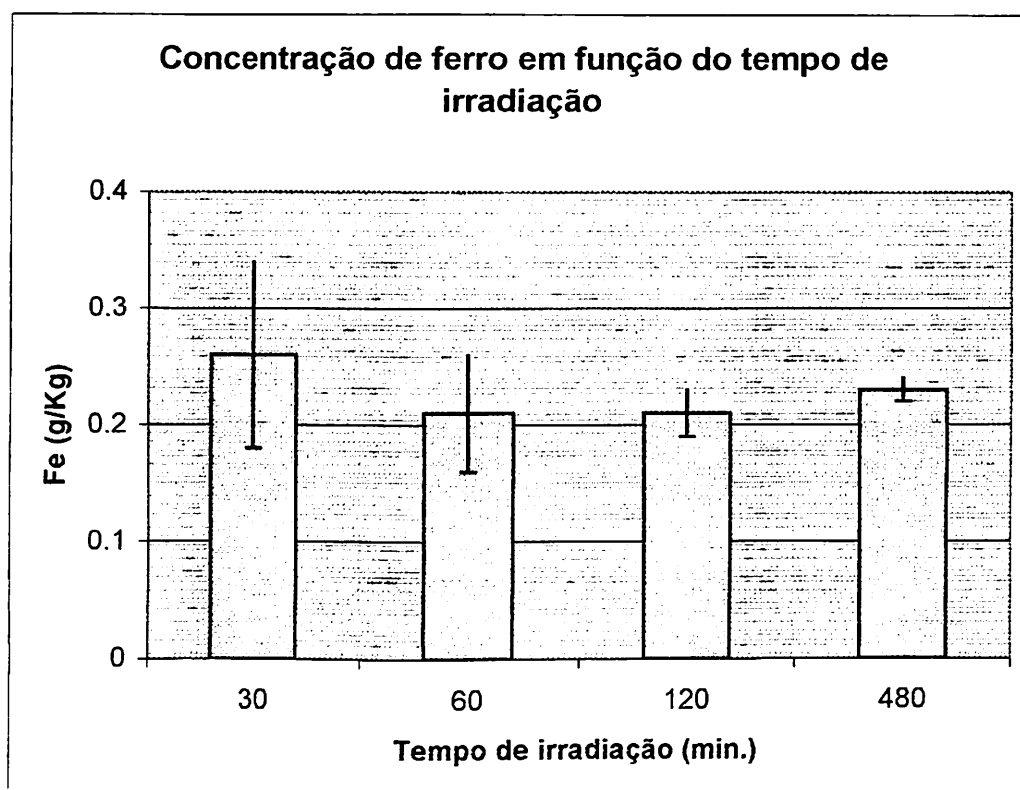


Figura 7. Concentração de ferro em sangue total. Os valores obtidos correspondem à ativação da alíquota de 500 μ l considerando-se um fluxo da ordem de 10^{12} n $\text{cm}^{-2}\text{s}^{-1}$.

6 DISCUSSÃO

A determinação da concentração de ferro no organismo humano é informação valiosa para a clínica, pela importância desse elemento no metabolismo e as patologias associadas à sua carência e/ou ao seu acúmulo, daí a variedade de ferramentas disponíveis para a quantificação desse elemento. Porém, apesar da grande oferta de técnicas quantitativas, alguns fatores limitam seu uso (hemossiderina na medula óssea) pelo grau de invasividade da técnica e outros induzem a erro, como a presença de infecções no indivíduo, condições da amostra etc.

O uso da técnica de ativação com nêutrons fornece informações quali - quantitativa dos materiais ativados com um diferencial importante: a utilização de sangue total, dispensando o uso de anticoagulantes, excluindo a necessidade de separação do soro e reduzindo interferências relevantes que alteram resultados nos ensaios colorimétricos como nos casos de amostras hemolisadas ou lipêmicas, por exemplo.

A metodologia nuclear apresentada reduziu significativamente a quantidade de material biológico necessário para execução da quantificação de ferro em sangue total, conseqüentemente, diminuiu também o tempo de preparo e o período de manuseio do sangue pelo corpo técnico do laboratório. Além disso, por utilizar sangue total na realização da análise tem-se uma redução também nos custos envolvidos, desde a coleta do material bem como na sua quantificação, pois dispensa o uso de reagentes e o emprego de várias análises clínicas em

comparação com o procedimento convencional (dosagem do ferro sérico, ferritina e capacidade total de fixação do ferro), além de facilitar seu transporte e permitir sua reavaliação, se necessário, após o término de sua atividade residual que é de aproximadamente três meses. Um fluxograma comparativo entre os métodos (convencional e nuclear) é apresentado na figura 8.

Apesar da metodologia nuclear ter sido aplicada também às amostras de soro o elemento ferro não sofreu ativação suficiente para que se pudesse mensurá-lo de forma precisa, comparativamente à análise de sangue total, fato este que se deve a maior concentração de ferro em sangue total.

Em vista da padronização da alíquota e do tempo adequado para a ativação e mensuração do ferro nas amostras, da viabilidade da técnica e os benefícios oferecidos, ainda resta estabelecer os valores de referência (VETERBERG *et al.*, 1993) para o elemento ferro em amostra de sangue total de humanos "saudáveis", considerando as condições de padronização estabelecidas no presente estudo. Desta forma ter-se-á uma ferramenta precisa para futuras avaliações de patologias relacionadas ao excesso ou deficiência de ferro em sangue total de humanos.

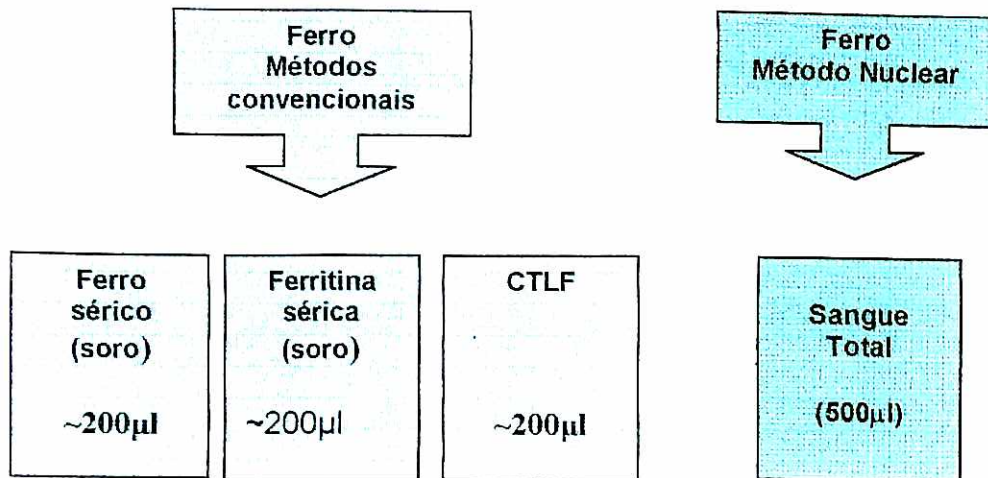


Figura 8. Fluxograma

7 CONCLUSÕES

1. A metodologia nuclear para a determinação de Ferro foi otimizada para o uso do sangue total;
2. Foi possível a padronização da técnica nuclear para a dosagem de ferro, sendo estabelecida alíquota de 500µl de sangue total em 120 minutos de irradiação, com nêutrons do Reator IEA-R1 do IPEN.
3. A reprodutibilidade foi possível após o período de atividade residual de 3 meses;
4. Condições como hemólise não interferem na quantificação do ferro:
5. Perspectivas futuras: estabelecer os valores de referência para o elemento ferro em sangue total.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNOLL, M D.; MARTINEZ, M B. Uptake of iron from different compounds by enteroinvasive escherichia coli. **Rev de Microbiologia** 1999 30;149-152.

ANTENOR, S. Leitura Magnética. **Pesquisa Fapesp**. v. 90, p. 70-71, ago, 2003.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR: Informação e Documentação – Referências – Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR10520: Informação e documentação – Citações em Documentos – Apresentação – Elaboração**. Rio de Janeiro, 2002.

AWAD, W.M. Metabolismo do heme e do ferro. In: DEVLIN, T.M. (Org.) **Bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo, Edgard Blücher, 1998.

BEGUIN, Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erithropoiesis. **Haematologica**, 1992. In: LIMA, G.A.F.M.; GROTTTO, H.Z.W. Soluble transferrin receptor and immature reticulocytes are not for distinguishing iron-deficiency anemia from heterozygous beta-thalassemia. São Paulo, **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 38, n.4, 200.p.273-280

CALADO, R.T.; ALBERTO, F.L.; FALCÃO, R.P. Metabolismo do ferro. In: ZAGO, M.A. *et al* (Org.). **Hematologia: fundamentos e prática**. São Paulo, Atheneu, 2001.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de doença crônica. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**. São José do Rio Preto, 2002. Disponível em http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid+S151684842002000200009&lng=... Acesso em 12 jun. 2003.

COOK, J.D; BAYNES, R.D.; SKIKNE, B.S. Iron deficiency and the measurement of iron status. In: PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Rev Saúde Pública**. v.34, p. 421-26, 2000.

FAIRBANKS, V.F.F.; KLEE, G.G. Aspectos Bioquímicos da Hematologia. In: BURTIS, C .A.; ASHWOOD, E.R. **Tietz: fundamentos de química clínica**. 4. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1998.

FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S.; COVELL, A.; COOK, J.D. The clinical measurement of serum transferrin receptor. In: PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Rev. Saúde Pública**. v.34, p. 421-26, 2000.

GOFFON, P. **Manual do programa IDF**. São Paulo: Universidade de São Paulo, IFUSP, 1987.

HASTKA, J.; LASSERRE, J.J.; SCHWARZBECK, A.; REITER, A.; HEHLMANN, R. Laboratory tests of iron status: correlation or common sense?, *Clin Chem*, 1996. In: NASCIMENTO, M.L.P.(Org.). Importância da avaliação do RDW em relação aos valores de ferritina. *NewsLab*. 44 ed, p. 86-94, 2001.

KOHGO, Y.; NISHISATO, T.; KONDO, H.; TSUSHIMA, N.; NIITSU, Y.; URUSHIZAKI, I. Circulating transferrin receptor in human serum. In: PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C.; GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Rev. Saúde Pública*. v.34, p. 421-26, 2000.

LABBE, RF; VREMAN, H J; STEVENSON, D K. Zinco protoporfirina: um metabólito com uma missão. *Laes & Haes*, ano 21, n. 123 p.154-186, 2000.

LYNCH, S.R. **Interection of iron with older nutrients**. *Nutrition Review*, v. 55, n.4, p.102-10, 1997. In: MARTINI, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos**. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2002. p.98 (Dissertação de mestrado).

LORENZO, J.D. *et al*. Assessment of erythropoiesis activity during hemodialysis therapy by soluble transferrin receptor levels and ferrokinetic measurements. *American Journal of Kidney Diseases*, v. 37, p. 550-56, 2001.

MARTINI, F.C.C. **Comparação entre a disponibilidade de ferro na presença de vitamina A e beta-caroteno em alimentos e medicamentos**. Piracicaba, Universidade de São Paulo, 2002. p.98 (Dissertação de mestrado).

MCLEROY, W.N; BERG, S.; CROCKETT, T.; HAWKINS, R.G. **SAND II-a computer automated interative method for neutron flux-spectra determination by foil activation**. AFWL-TR-67-41, Sept. 1967.

MEDEIROS, J.A.G. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares-IPEN**. São Paulo, Comunicação Interna, 2002.

MESTINICK F., J. **A distribuição espacial de fluxo de nêutrons no núcleo do reator IEA-R1, obtida por meio da ativação de folhas**. São Paulo, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1978.

MUECK, K.; BENSCH, F. Cadmium correction factors of several thermal neutron foil detectors. *J. Nucl. Engl.*, 27: 677-88, 1973.

OLIVEIRA, L.C. **Desenvolvimento de metodologia nuclear para análises clínicas**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. São Paulo, 2003. (Dissertação de mestrado)

OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B. *et al.* Analysis of certified biological reference materials using the Absolute NAA. In: 11 th INTERNATIONAL CONFERENCE ON MODERN TRENDS IN ACTIVATION ANALYSIS, 20-25 June, Guildford-England, 2004.

OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B. *et al.* Nuclear methodology for studying biological functions of mammals submitted to uranium ingestion. *Rev. Bras. Pesq. Des.* v. 4, n. 3, Parte 1, p. 1035 – 1039, 2002.

OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B. *et al.* **Use of thermal neutrons to perform clinical analyses in blood and urine samples.** In: VI INTERNATIONAL CONFERENCE ON METHODS AND APPLICATIONS OF RADIOANALYTICAL CHEMISTRY. April 7-11, Kailua-Kona, HI, USA, 2003.

OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B.; *et al.* Use of Thermal Neutrons to Perform Analyses in Body Organs of Small-Sized Animals. *Brazilian Journal of Physics*, v. 34, n. 3, 2004.

OLIVEIRA, L.C.; ZAMBONI, C.B. *et al.* **Nuclear methodology to perform clinical examination of urine.** In: III ENCONTRO NACIONAL DE BIOCÊNCIAS NUCLEARES. p.50, 03-06 setembro, Gramado, 2001.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais.** 6ª edição, Ed Guanabara Koogan, 1995 p.20-5.

RICHARDSON, D.; BARTLETT, C.; WILL, E.J. Optimizing erythropoietin therapy in hemodialysis patients. *American Journal of Kidney Diseases*, v 38, n. 1, p.109-117, 2001.

TIETZ *et al.* Quando um ferro sérico é realmente um ferro sérico? Um estudo sobre as dosagens de ferro no soro. *Laes & Haes*, ano 21, n. 123, p.146-150 fev/mar, 2000.

VESTERBERG, O. *et al.* International project reference values for concentrations of trace elements in blood and urine – TRACY. *Scand Work Environ Health*. v.19 (Suppl. 1), p. 19-26, 1993.

YIP, R. The epidemiology of childhood iron deficiency: evidence for improving iron nutrition among US children. In: Dobbing, J. ed. Brain, behaviour and iron in the infant diet. In: QUEIROZ, S.S. *et al.* Anemia ferropriva na infância. *Jornal de Pediatria*. v.76, 3, p. S298-S304, 2000.

ZAMBONI, C.B.; MEDEIROS, I.M.M.A *et al.* **Nuclear Methodology to Study Kidney Anomalies.** In: V ENCONTRO NACIONAL DE APLICAÇÕES NUCLEARES – ENAN, Rio de Janeiro, 2000.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito da pesquisa que será realizada com minha amostra de sangue, ficando claro que minha participação é isenta de despesas e de quaisquer riscos, com garantia de confidencialidade e esclarecimentos permanentes.

Concordo voluntariamente a participar deste estudo sem prejuízo de qualquer benefício que eu tenha adquirido.

Assinatura do doador

Testemunha

São Paulo, ___ de _____ de 2004.

ANEXO II

TABELA DE PARÂMETROS NUCLEARES

Isótopo	Energia (KeV)	T _½ (d)	M	σ (b)	I _γ (%)	λ (s)
Fe ⁵⁸	1099,25	44,5	55,85	1,15	56,5%	1,8 x 10 ⁻⁷
Au ¹⁹⁷	411,80	2,7	196,97	98,65	95,5	2,97x10 ⁻⁶