

# USO DE METODOLOGIA NUCLEAR PARA QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM AMOSTRAS DE SANGUE DE HUMANOS COMO ALTERNATIVA PARA AVALIAÇÃO CLÍNICA

Patrícia S. Lins<sup>1</sup>, Cibele B. Zamboni<sup>1</sup>, Maria Regina A. Azevedo<sup>2</sup> e  
Ilca M. M. A. Medeiros<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN / CNEN - SP)  
Av. Professor Lineu Prestes 2242  
05508-000 São Paulo, SP  
czamboni@ipen.br

<sup>2</sup> Universidade de Santo Amaro (UNISA – SP)  
R Enéas de Siqueira Neto 340  
04829-300 São Paulo, SP  
mazvedo@unisa.br

## RESUMO

Este trabalho tem por objetivo obter a concentração de Ferro em sangue total utilizando o método Absoluto de Análise por Ativação por Nêutrons. Os resultados mostram a viabilidade da metodologia nuclear para uso em análises hematológicas e em estudos relacionados à Anatomia Patológica e Patologia Clínica que visam elucidar o metabolismo do ferro e a sua determinação nos organismos vivos. É apresentada também uma discussão envolvendo as vantagens e limitações do uso da técnica comparativamente aos métodos convencionalmente empregados.

## 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. O ferro é absorvido através da dieta diária e não possui via fisiológica de excreção, desta forma, o controle da quantidade de ferro corporal é feito pela regulação de sua absorção pelo organismo. Em casos de carência de ferro, as manifestações se tornarão evidentes clínica e laboratorialmente, somente quando o estoque orgânico estiver exaurido, estabelecendo-se a anemia ferropriva. Por outro lado, qualquer falha no complexo mecanismo regulador da absorção e disponibilização do ferro podem incorrer em um acúmulo desse elemento no organismo, em órgãos como o fígado e o coração, o que é potencialmente danoso, caracterizando a hemocromatose, ou ainda, distúrbios na utilização do ferro pelos precursores eritróides, permanecendo na forma de depósito característico da anemia de doenças crônicas.

Dada a importância da manutenção dos níveis de ferro dentro da normalidade, são vários os ensaios para sua quantificação, usando soro, mas nenhum deles isoladamente é suficientemente sensível ou específico para avaliar o *status* de ferro orgânico. O melhor marcador de Fe não existe, entretanto, os diferentes testes complementam-se por detectar

diferentes estágios e mostrar individualmente a extensão clínica da deficiência e/ou acúmulo de ferro no organismo [1]. Na prática, o parâmetro laboratorial considerado como “padrão ouro” para avaliação do *status* de ferro no organismo constitui a pesquisa de *in vitro* de hemossiderina nas células da medula óssea, com reação química do azul-da-prússia. A hemossiderina consiste numa das formas de armazenamento do ferro presente em grande parte em macrófagos e monócitos da medula óssea; sua ausência é indicativa de depleção do ferro orgânico. Esse exame apesar de conclusivo trata-se de um método impróprio para triagem pelo seu caráter invasivo [2], além disso, a biópsia de medula óssea é mais recomendada do que o aspirado e visto que as amostras devem ser descalcificadas, os agentes utilizados nesse processo poderiam destruir certa quantidade de ferro [3]. Usualmente, para a quantificação precisa de Fe, faz-se necessário uma amostra livre de interferentes como hemólise, hiperlipemia, e presença de processos infecciosos no organismo. Além disso, esta quantificação requer a combinação de várias técnicas como: dosagem do Ferro Sérico, Ferritina Sérica, Saturação de Transferrina (ST) e Capacidade Total de Fixação do Ferro (CTFF), realizadas em soro [1].

Particularmente no Brasil, considerando-se que a anemia por deficiência de Fe é um problema de saúde pública, atingindo cerca de 60% da população, principalmente crianças de 4 a 24 meses de idade, adolescentes do sexo feminino, gestantes e nutrízes [4] justifica-se a busca de métodos alternativos para quantificação de Fe em sangue sendo de fundamental importância em patologia clínica.

O presente estudo é portanto, dedicado à avaliação do uso de metodologia nuclear para aplicação na área médica, mais especificamente, em Patologia Clínica. A relevância deste estudo reside no fato de que o diagnóstico tradicional, para identificação do quadro anêmico, necessita da pesquisa de hemossiderina e/ou de várias análises laboratoriais em soro [1]. Além disso, esses ensaios requerem equipamentos apropriados, padronização da coleta e conservação da amostra, fatores estes que contribuem tanto para o elevado custo dessas análises bem como no prazo de obtenção dos resultados.

## **2. METODOLOGIAS DISPONÍVEIS PARA A DETERMINAÇÃO DO FERRO**

A determinação da Ferritina Sérica é útil para uma estimativa das reservas orgânicas de Fe. Entretanto, sua estimativa pode ter interferência de infecções crônicas, distúrbios inflamatórios e neoplasias, o que vem dificultar o estabelecimento de um ponto de corte plausível para a avaliação do status de ferro corporal. Sua dosagem no soro pode ser realizada por muitos métodos, como ensaio imunoradiométrico, ensaio imunoenzimático e ainda por quimioluminescência. Complementar à dosagem da Ferritina Sérica tem-se a avaliação da CTFF que consiste na medida da concentração máxima de Fe que as proteínas do soro podem transportar. Esta avaliação é útil na identificação de um quadro ferropênico, quando ocorre um aumento deste parâmetro (CTFF), indicando uma maior necessidade de transporte de ferro. Por outro lado, situações nas quais há inflamação, este parâmetro encontra-se reduzido. Há outras situações ainda, em que inflamação e a ferropenia estão presentes mas a avaliação da CTFF encontra-se normal, o que o torna este último um método menos fidedigno. Na prática, sua determinação é feita colorimetricamente pela adição de Ferro Férrico, na amostra de soro, em quantidade suficiente para saturar os sítios de ligação da transferrina; após a leitura da absorvância (A1), é adicionado carbonato de magnésio que forma um complexo magenta brilhante com o ferro em excesso e uma posterior leitura da absorvância é realizada

(A2). A CTFF é calculada baseada na subtração das absorbâncias obtidas e a quantidade de Ferro Sérico da amostra.

A determinação do Ferro Sérico é também uma ferramenta muito utilizada pelos laboratórios de análises clínicas, pois trata-se de um parâmetro bastante sensível quando as reservas corporais do Fe já estão esgotadas. Mas, é um parâmetro também passível de interferências quando há processos infecciosos, gestação ou ainda quando a concentração de ferritina na amostra de soro apresenta concentrações superiores a  $100 \mu\text{g/l}$  [3]. Sua determinação baseia-se na liberação do Ferro Férrico ligado a transferrina em condição de pH do soro reduzido, havendo uma conversão do Ferro Férrico para Ferro Ferroso, que será complexado a um cromógeno de elevada absorbância, a batofenantrolina e a ferrozina, para que posteriormente seja efetuada a leitura espectrofotométrica. A partir da relação entre a dosagem de Ferro Sérico e a CTFF, obtém-se a Saturação da Transferrina (ST), onde,  $ST(\%) = 100 \times \text{Fe}$  na capacidade total de ligação de Fe do soro.

Como se pode constatar estas metodologias são complementares e necessitam de elaborado preparo e manuseio do material biológico pelo corpo técnico, pois envolvem desde a separação soro ou plasma até a realização dos vários ensaios.

### 3. METODOLOGIA NUCLEAR PARA A DETERMINAÇÃO DO FERRO

Fazendo uso do método Absoluto de Análise por Ativação com Nêutrons pretende-se obter a concentração de Ferro em sangue com precisão e vantagens, comparativamente aos procedimentos convencionais, pois parte-se de uma simplificação importante que é a utilização de sangue total, que dispensa o uso de anticoagulantes e reagentes específicos, excluindo assim a necessidade de separação do soro e conseqüentemente reduzindo interferências relevantes que alteram resultados nos ensaios colorimétricos, como nos casos de amostras hemolisadas ou lipêmicas, por exemplo.

O método nuclear consiste em irradiar pequenas quantidades de material biológico com nêutrons e analisar as radiações gama induzidas após a ativação que, por sua vez, geram informações quali - quantitativas dos materiais biológicos ativados. Entretanto, para a utilização deste método é necessário o conhecimento do fluxo de nêutrons, o qual pode ser obtido empregando-se a técnica da Razão de Cádmiu [5]. Esta etapa consiste em irradiar cada amostra biológica, juntamente com detectores de ativação, no caso folhas de Au (nua e coberta com Cd), no reator IEA-R1. Desta forma obtém-se os espectros de raios gama tanto para o cálculo do fluxo bem como para a obtenção da concentração do elemento Fe, nas mesmas condições de irradiação. Após a irradiação, os detectores de Au são submetidos à contagem, no espectrômetro de raios gama, permitindo a identificação e cálculo da área da transição gama de 411keV do  $^{197}\text{Au}$  para determinação do fluxo de nêutrons. Da mesma forma, a amostra biológica é também submetida à contagem, permitindo a identificação e cálculo das áreas das transições de interesse no Fe, que correspondem as energias de 1099 e 1291 keV. Esses parâmetros juntamente com a curva de eficiência do espectrômetro gama [5] irão fornecer subsídios para a quantificação do Fe. Para esta etapa do trabalho utiliza-se códigos computacionais desenvolvidos para atender essas necessidades simplificando o procedimento de análise de dados [6,7].

#### 4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

Para realização das análises de 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 à respeito do trabalho em desenvolvimento, conforme padrões éticos para trabalho envolvendo seres humanos. A população escolhida para o estudo foi a de doadores de sangue, cujo perfil atende ao padrão previsto em legislação própria, com faixa etária definida, bem como valores de hemoglobina, pressão arterial, ausência de febre e sorologia negativa prevista para doadores de sangue, buscando evitar prejuízos à saúde do doador e do receptor do sangue. Esses fatores foram considerados importantes numa tentativa de minimizar situações como processos infecciosos ou doenças crônicas, por exemplo, que interferem nos valores normais do Ferro Sérico, já que excluí-los ainda não é possível pelos parâmetros estabelecidos na legislação vigente. Foram colhidas de cada doador amostras de sangue total (~2ml), na ausência de qualquer tipo de anticoagulante. Imediatamente após a coleta, alíquotas de 500µl de sangue total foram transferidas para cilindros plásticos, apropriados para coleta de material biológico, antes do processo de coagulação. Sempre que possível (isto é, antes do processo de coagulação) as amostras foram preparadas em duplicata. O sangue restante, no tubo de coleta, foi centrifugado a 3.000rpm durante 10 minutos para a obtenção do soro. Posteriormente, as amostras biológicas juntamente com os detectores de ativação (folhas de Au com ~0,8 mg, cada) foram submetidas a 1 hora de irradiação com nêutrons, no Reator IEA - R1 do IPEN, para posterior análise.

De acordo com este procedimento foi possível estabelecer as condições de otimização do método nuclear para alíquotas de 500µl de sangue total, irradiação de 1 hora, tempo de resfriamento de 12 horas e 2 horas de contagem. Para os detectores de ativação os espectros necessitam de 30 segundos de contagem. As medidas de BG são realizadas para as duas etapas: 2 horas e 30 segundos, respectivamente. Desta forma, em média, em 24 horas é possível a conclusão da análise de Fe em sangue total via metodologia nuclear.

Na Tabela 1 são apresentados os resultados obtidos para concentração de Fe bem como dos demais elementos passíveis de quantificação, além disso, foram incluídas nesta tabela os resultados da análise de duas amostras, descartadas pelo Banco de Sangue, que sugerem a existência de uma correlação entre os elementos medidos em função da variação (no caso déficit) de Fe.

Com relação às amostras de soro, parte deste material biológico foi submetido aos testes clínicos para seleção dos doadores, e parte (sempre que disponível) submetida ao mesmo procedimento de irradiação (500µl de soro irradiados por 60 minutos), entretanto, a ativação do Fe em soro só veio a ocorrer após 8 horas de irradiação. Portanto, a utilização de soro não traz vantagens comparativamente ao uso de sangue total e nem com relação aos procedimentos convencionais, pois além de necessitar de longo período de irradiação e conseqüentemente longo período de espera, da ordem de 48 horas (no mínimo), em função da alta atividade induzida devido a presença de Na e K para que seja possível seu manuseio e quantificação.

**Tabela 1. Concentração dos elementos ( $\text{g l}^{-1}$ ) medidos em sangue total .**

Amostras	Br	Ca	K	Na	Fe
D1	$0,0050 \pm 0,0014$	nd	$1,43 \pm 0,14$	$1,48 \pm 0,05$	$0,26 \pm 0,07$
D2	$0,0046 \pm 0,0006$	nd	$1,13 \pm 0,13$	$1,45 \pm 0,05$	$0,29 \pm 0,08$
<sup>a</sup> D3	$0,0064 \pm 0,0009$	$0,18 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,17$	$1,52 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,09$
D4	$0,0087 \pm 0,0011$	$0,27 \pm 0,07$	$1,45 \pm 0,18$	$1,71 \pm 0,06$	$0,29 \pm 0,07$
D5	$0,0071 \pm 0,0008$	$0,18 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,16$	$1,72 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,07$
D6	$0,0035 \pm 0,0004$	$0,23 \pm 0,04$	$1,41 \pm 0,09$	$1,48 \pm 0,05$	$0,20 \pm 0,07$
D7	$0,0066 \pm 0,0025$	$0,19 \pm 0,04$	$1,52 \pm 0,10$	$1,54 \pm 0,05$	$0,31 \pm 0,07$
D8	$0,0089 \pm 0,0019$	$0,21 \pm 0,04$	$1,35 \pm 0,10$	$1,46 \pm 0,05$	$0,24 \pm 0,08$
<sup>b</sup> D9	$0,0035 \pm 0,0009$	$0,09 \pm 0,02$	$0,78 \pm 0,06$	$1,04 \pm 0,03$	$0,08 \pm 0,08$
<sup>b</sup> D10	$0,0036 \pm 0,0007$	$0,20 \pm 0,04$	$1,65 \pm 0,12$	$1,73 \pm 0,06$	$0,11 \pm 0,07$

a. sem duplicata

b. dosagem de Ferro Sérico  $< 0,6\text{g l}^{-1}$

nd: não determinado

## 5. CONCLUSÃO

A determinação da concentração de Fe no organismo humano é informação valiosa para a clínica, pela importância desse elemento no metabolismo e sua correlação com as patologias associadas à sua carência e/ou excesso, daí a variedade de ferramentas disponíveis para sua quantificação. Apesar da grande oferta de técnicas laboratoriais quantitativas, alguns fatores limitam a sua utilização, seja pelo caráter invasivo da técnica ao paciente (hemossiderina na medula óssea) ou por fatores externos interferentes à exemplo de infecções, gestação ou condições da amostra após a coleta.

O uso da técnica de ativação com nêutrons fornece a quantificação de ferro de forma ágil e precisa com um diferencial importante, a utilização de sangue total, eliminando a etapa de separação do soro, simplificando o procedimento de coleta e reduzindo, também, o tempo de preparo e o período de manuseio do sangue pelo corpo técnico do laboratório, além de permitir sua reavaliação, se necessário, após o término de sua atividade residual que é de aproximadamente três meses. Outro aspecto positivo, extraído deste estudo, relaciona-se ao uso da estimativa de Fe em sangue total como parâmetro para avaliação de disfunções associadas ao seu acúmulo ou déficit no organismo, dispensando o emprego e associação dos vários exames laboratoriais convencionais para interpretação dos resultados.

Neste estudo a metodologia nuclear para determinação de Fe foi otimizada para uso em sangue total permitindo sua quantificação em 24 horas. Embora este procedimento tenha sido aplicado também a análise de Fe soro, sua utilização não traz vantagens comparativamente ao uso de sangue total pois além de necessitar de longo período de irradiação (8horas) e de espera (dias) ainda requer a etapa de separação do soro. Além disso, os valores obtidos de Fe em soro via ativação neutrônica não geram informação adicional relevante pois um confronto com os valores estabelecidos pelos os métodos convencionais, como descritos na seção 2, não permitem um comparação fidedigna, pois os valores associados a medidas de Fe no soro (valor de referência atribuído a cada uma das análises) estão relacionadas a sua condição

iônica enquanto a avaliação via metodologia nuclear fornece uma estimativa da concentração total de ferro no sangue.

Finalmente tem-se ainda, entre as vantagens do uso do método, a possibilidade da quantificação de outros elementos que também são ativados, como: Br, Ca, K e Na, o que nem sempre é possível pelos procedimentos usuais. Esta simultaneidade das análises abre uma nova perspectiva para o estudo das funções do Ferro no sangue pois permitirá avaliar as correlações entre os elementos medidos.

Considerando-se a viabilidade do emprego do método nuclear, para determinação da concentração de Ferro em sangue total, tem-se um desdobramento importante deste estudo que diz respeito à necessidade de estabelecer seu valor de referência em sangue total, para viabilizar seu emprego em análises hematológicas e em estudos relacionados a Anatomia Patológica e Patologia Clínica, que visam elucidar o metabolismo do Fe e a sua determinação nos organismos vivos.

### AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a equipe do Banco de Sangue Paulista pelo apoio técnico na coleta de sangue.

### REFERÊNCIAS

1. M.L.P. Nascimento, “Importância da avaliação do RDW em relação aos valores de ferritina”, *NewsLab*. **44**, pp. 86-94 (2001).
2. A.A. Paiva, P.H.C. Rondó, E. M. Guerra-Shinohara, “Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro”, *Rev. Saúde Pública*. **34**, p. 421-26 (2000).
3. R. Ravel *Laboratório Clínico: aplicações clínicas dos dados laboratoriais*. 6ª edição, Ed Guanabara Koogan, pp.20-25 (1997).
4. S.S. Queiroz, “Anemia ferropriva na infância”, *Jornal de Pediatria*. **76**, pp.298-304 (2000).
5. L.C. Oliveira, *Desenvolvimento de metodologia nuclear para análises clínicas*. Dissertação de mestrado, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN. São Paulo (2003).
6. P. GOFFON, *Manual do programa IDF*. São Paulo, Universidade de São Paulo, IFUSP (1987).
7. J.A.G. Medeiros, *Private communication*, IPEN (2003).