

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS)
FACULDADE DE MEDICINA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO: CIÊNCIAS EM GASTROENTEROLOGIA

Dissertação de Mestrado

**QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO ATRAVÉS
DE ESPECTROSCOPIA POR ABSORÇÃO ATÔMICA:
VALIDAÇÃO DO MÉTODO COM FÍGADO BOVINO E AVALIAÇÃO
COMPARATIVA ENTRE TECIDO FRESCO E TECIDO
CONSERVADO EM PARAFINA**

Autor: ANDRÉ CASTAGNA WORTMANN

**ORIENTADORES: Prof.Dra. THEMIS REVERBEL DA SILVEIRA
Prof. Dr. PEDRO EDUARDO FROELICH**

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desta etapa a algumas pessoas muito especiais, sem as quais a satisfação e a alegria por esta conquista não teriam o mesmo valor:

Aos meus pais, Ney e Maria Lúcia, e minha irmã Sílvia, pelo amor, o carinho e o apoio que sempre fizeram a diferença para mim.

À minha esposa Maritza, pelo seu amor e cumplicidade na trajetória de nossas vidas.

A dois grandes mestres e amigos, Professor Sérgio Buttes Cordeiro e Professor Luiz Edmundo Mazzoleni, cuja paixão pelo ensino e dedicação às suas profissões me ensinaram muito mais do que as aulas ou os livros permitem aprender. Seus ensinamentos muito me inspiram até hoje.

Ao Doutor Jorge Ilha Guimarães, pela disponibilidade incondicional e sabedoria em aconselhar e estimular o meu desenvolvimento profissional. O convívio de mais de uma década com nossa família revelou muito mais que um excelente médico: um verdadeiro amigo.

AGRADECIMENTOS

A realização do presente estudo não teria sido possível sem a participação de várias pessoas, vinculadas a diversos setores da Universidade. Registro aqui o meu profundo agradecimento a alguns destes profissionais e às Instituições que representam:

À Professora Doutora Themis Reverbel da Silveira, por ter aberto todas as portas necessárias para o desenvolvimento do estudo, coordenado e motivado com sua energia e capacidade de realização o andamento dos trabalhos, e iluminado com sua sabedoria os caminhos trilhados até a conclusão desta obra. Foi um privilégio e uma grande satisfação ter tido a oportunidade de complementar minha formação acadêmica e profissional sob sua orientação.

Ao Professor Doutor Pedro Eduardo Froehlich, pela oportunidade de desenvolver um estudo multidisciplinar, ampliando os horizontes do conhecimento e da pesquisa além dos limites das nossas áreas de atuação de origem, e pela sua contribuição inestimável em todas as fases do projeto. Além de qualificado e experiente profissional, mostrou-se incansável na superação dos problemas técnicos enfrentados, e na transmissão de conhecimentos científicos tão específicos a um novo campo da Ciência, com a qual tive contato neste Projeto.

Aos colaboradores do estudo, Doutora Raquel Borges Pinto, Richard Borba de Magalhães, Professor Carlos Thadeu Schimidt Cerski e Doutor Marcelo Vasconcellos Vieira, colegas tão importantes no desenvolvimento deste projeto.

Ao Doutor e amigo Mário Reis Álvares-da-Silva, por constituir-se em uma referência para mim na área da Hepatologia, motivando, com sua dedicação, qualificação profissional e sucesso, a trajetória acadêmica e científica de vários de seus alunos.

Ao grande amigo e colega, Guilherme Becker Sander, pelo apoio na volta ao convívio científico-acadêmico, e pela ajuda e sugestões em incontáveis momentos ao longo desta jornada.

À Equipe de Assessoria em Bioestatística do Grupo de Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial à monitora Daniela Benzano, pelo auxílio na análise dos dados.

Aos estagiários e bolsistas de Iniciação Científica da Faculdade de Farmácia da UFRGS, Jéferson José Ferreira, Marcela Heck e Adriana Steffens, que eficientemente desempenharam suas atividades sob a orientação do Professor Pedro Eduardo Froehlich.

À equipe do Banco de Ossos do HCPA, representada pelo Doutor Carlos Roberto Galia por disponibilizar o uso do aparelho liofilizador para o preparo do tecido hepático e, em especial, à secretária Tielle Muller de Mello, cuja disponibilidade e atenção dispensadas durante o período de realização do estudo neste Serviço foram imprescindíveis.

À equipe do Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA, em especial à técnica Flávia Giusti, pela assistência no processamento das amostras de fígado bovino.

À Professora Maria Tereza Vizcaichipi Sanhotene, que gentilmente prontificou-se em auxiliar na revisão ortográfica e gramatical desta obra,

qualificando-a com os ajustes necessários para o correto emprego da língua portuguesa.

Aos amigos Jaime Arrarte e Anelise Fillippon, pelo incentivo e amizade sempre presentes. O apoio incansável na melhoria dos aspectos gráficos deste estudo contribuiu muito para o aprimoramento do mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, em especial ao Professor Doutor Sérgio Gabriel da Silva Barros, cuja dedicação e postura crítica são fundamentais para o funcionamento do curso e o aprimoramento de seus alunos.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação Ciências em Gastroenterologia, Moema Vianna Goulart e Mirian Tatiane de Souza, pelo apoio sempre importante ao longo destes anos.

Ao Serviço de Gastroenterologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, representado pelo Professor Doutor Carlos Fernando de Magalhães Francisconi, pelo importante papel desempenhado em minha formação médica. O alto nível acadêmico dos Professores do Serviço contribuiu para o desenvolvimento de uma postura científica crítica, estimulando a busca por um aperfeiçoamento profissional e acadêmico, como a realização de um Mestrado.

Ao amigo e colega de Mestrado, Everton Hadlich, pelo seu apoio.

Aos Doutores Úrsula Matte e Jarbas de Oliveira, pela qualificada contribuição através de suas participações como comentaristas na atividade dos Seminários de Pesquisa, analisando criticamente o projeto e as apresentações.

Ao Fundo de Incentivo para Pesquisa (F.I.P.E.) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, e à C.A.P.E.S., pelo apoio financeiro na realização deste projeto.

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| LISTA DE ABREVIATURAS | IX |
| LISTA DE FIGURAS | XI |
| LISTA DE QUADROS | XII |
| LISTA DE TABELAS | XII |
| RESUMO | XIV |
| <i>SUMMARY</i> | XVI |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Ferro: aspectos gerais e metabolismo | 1 |
| 1.2 Hepatotoxicidade do ferro | 3 |
| 1.3 Hepatopatia associada à sobrecarga de ferro | 6 |
| 1.4 Diagnóstico clínico e laboratorial da sobrecarga de ferro | 10 |
| 1.4.1 Quantificação de ferro no tecido hepático: espectroscopia por absorção atômica | 13 |
| 1.4.2 Validação de uma metodologia analítica | 14 |
| 1.5 Justificativa do estudo | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODO | 20 |
| 3.1 MATERIAIS | 21 |
| 3.2 MÉTODO | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 3.2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO | 22 |
| 3.2.1.1 Curvas de calibração com solução padrão de ferro e ensaio para a validação do método com padrão de referência de ferro para fígado bovino | 22 |
| 3.2.1.2 Parâmetros analíticos | 23 |
| 3.2.1.3 Quantificação de ferro hepático em amostras de tecido hepático bovino fresco | 24 |
| 3.2.1.4 Critérios de exclusão | 25 |
| 3.2.1.5 Análise estatística | 25 |
| 3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO HEPÁTICO EM TECIDO FRESCO E TECIDO SUBMETIDO À CONSERVAÇÃO EM PARAFINA | 26 |
| 3.2.2.1 Coleta e processamento das amostras de tecido hepático | 26 |
| 3.2.2.2 Tamanho amostral | 28 |
| 3.2.2.3 Quantificação de ferro | 28 |
| 3.2.2.4 Critérios de exclusão | 29 |
| 3.2.2.5 Análise estatística | 29 |
| 3.3 ASPECTOS ÉTICOS | 30 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO | 31 |
| 4.1.1 Linearidade | 31 |
| 4.1.2 Limites de detecção e de quantificação | 32 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 4.1.3 | Precisão | 33 |
| 4.1.4 | Exatidão | 34 |
| 4.1.5 | Quantificação de ferro em tecido hepático bovino | 36 |
| 4.2 | QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO FRESCO E TECIDO SUBMETIDO A CONSERVAÇÃO EM PARAFINA | 38 |
| 4.2.1 | Peso absoluto dos fragmentos | 38 |
| 4.2.2 | Análise comparativa da quantificação de ferro entre dois grupos: tecido fresco e tecido submetido à conservação em parafina | 39 |
| 5. | DISCUSSÃO | 42 |
| 5.1 | VALIDAÇÃO DO MÉTODO | 42 |
| 5.2 | COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO BOVINO FRESCO E EM TECIDO SUBMETIDO A CONSERVAÇÃO EM PARAFINA | 47 |
| 6. | CONCLUSÕES | 51 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 52 |
| 8. | ANEXOS | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP – adenosina tri-fosfato

CFH – concentração de ferro hepático

cm – centímetro

CV % - coeficiente de variação percentual

C282Y – mutação na posição 282 do cromossoma 6, com troca de cisteína por tirosina

Dcytb – citocromo duodenal b

DMT1 – transportador de metais bi-valente 1

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPR – desvio padrão relativo

FDA - *Food and Drug Administration*

Fe – ferro

HCPA – Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HFE – gene ou proteína HFE

HFE2 – Hemocromatose juvenil

HFE3 – Mutação do TRF-2 (*receptor 2 da transferrina*)

HFE4 – mutação da ferroportina

HH – hemocromatose hereditária

H1 – altura corresponde ao ruído de base produzido pelo espectrofotômetro de absorção atômica

H2 – altura correspondente ao pico de absorção

H63D – mutação na posição 63 do cromossoma 6, com troca de histidina por aspartato

IC – Intervalo de confiança

ICH - *International Conference on Harmonization*

IFH – índice de ferro hepático

IRE – elemento regulador do ferro

IRP – proteína reguladora de ferro (*iron regulatory protein*)

LAPPS- Laboratório de Produção de Padrões Secundários

LD – limite de detecção

LIP – carga de ferro lábil

LQ – limite de concentração

mg - miligramas

mg/ml – miligramas por mililitro

ml – mililitros

mm – milímetro

n – tamanho amostral

NIST – *National Institute for Standards and Technology*

NTBI – ferro não ligado à transferrina (*non transferrin bound iron*)

ppb – partes por bilhão

ppm – partes por milhão

PxL – peroxidação lipídica

r – coeficiente de correlação de Pearson

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

TRF 1 – receptor de transferrina 1

TRF2 – receptor da transferrina 2

UA – unidades de absorvância

UFRGS – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

α - nível de significância

β - beta

$\mu\text{g/g}$ (ou mcg/g) – microgramas por grama

μl – microlitros

$\mu\text{M/g}$ – micromol por grama

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|-----------|
| Figura 1 – Um modelo das vias de absorção do ferro pelo enterócito. | 3 |
| Figura 2 – Mecanismos de toxicidade por ferro; ênfase sobre o papel da lesão sobre as organelas. | 5 |
| Figura 3 – Fluxograma da comparação da quantificação de ferro em tecido hepático fresco e submetido à conservação em parafina | 29 |
| Figura 4 – Curva de calibração com uma solução-padrão de ferro: quantificação de ferro através de espectroscopia por absorção atômica (1º dia de experimento) | 32 |

Figura 5: Registro do pico de absorção (H2) versus tempo (em segundos) para uma amostra de ferro (padrão NIST) contendo 20 ppb de ferro (Fe), utilizada para determinar os limites de detecção e quantificação. O volume injetado foi 10 µl. 33

Figura 6: Concentração de ferro hepático (CFH) em amostras de fígado bovino. 38

Figura 7: Concentração de ferro hepático (CFH) em tecido hepático fresco e tecido submetido à conservação em parafina, conforme Teste t de Student para amostras emparelhadas. 41

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação dos estados de sobrecarga de ferro. 7

Quadro 2. Fórmula do Índice de ferro hepático (IFH): concentração de ferro hepático (CFH) dividida pela idade do paciente. 11

Quadro 3. Resultados da validação da quantificação de ferro hepático através da espectroscopia por absorção atômica 35

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|-----------|
| Tabela 1. Limites da concentração de ferro hepático (em $\mu\text{mol/g}$ e $\mu\text{g/g}$) na ausência e na presença de sobrecarga de ferro. | 11 |
| Tabela 2 – Precisão intra-dia (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 1º dia de experimento | 34 |
| Tabela 3 – Precisão intra-dia (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 2º dia de experimento | 34 |
| Tabela 4 – Precisão entre-dias (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 2 dias de experimentos | 34 |
| Tabela 5 – Exatidão (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST) | 35 |
| Tabela 6 – Características de 29 amostras consecutivas de fígado bovino: peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH – em ppm ou $\mu\text{g/g}$). | 37 |
| Tabela 7 – Peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH - em $\mu\text{g/g}$) das amostras de tecido hepático bovino fresco liofilizado (grupo A). | 40 |
| Tabela 8: Peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH em $\mu\text{g/g}$) das amostras de tecido hepático bovino submetido à conservação em parafina (grupo B). | 40 |
| Tabela 9: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias com agulha “tru-cut”: peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$). | 64 |

Tabela 10: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias “em cunha” (obs: amostra nº 30 = perda); peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$). **65**

Tabela 11: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias “em cunha” (obs: incluída amostra nº 11 = “outlier”); peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$). **66**

RESUMO

A determinação da concentração de ferro hepático (CFH) possui importantes implicações no diagnóstico clínico e na pesquisa dos estados de sobrecarga de ferro. O método de escolha para a quantificação de ferro hepático é a espectroscopia por absorção atômica (EAS), e a sua disponibilidade é restrita a centros de referência. Geralmente, são utilizados fragmentos de tecido hepático fresco obtidos por biópsias. Uma alternativa de grande interesse na prática clínica é a utilização de tecido conservado em parafina.

O presente estudo teve como objetivos desenvolver e validar uma metodologia para a quantificação de ferro no tecido hepático através da EAS, e comparar a CFH em amostras de tecido hepático fresco e naquelas conservadas em parafina.

A pesquisa foi desenvolvida em duas fases. Primeiramente, foram feitos experimentos para a validação do método, utilizando solução-padrão de ferro e padrão de referência para fígado bovino, do *National Institute of Standards and Technology* (NIST). Foram avaliados os seguintes parâmetros analíticos, seguindo-se as diretrizes de validação da *International Conference on Harmonization* (ICH): linearidade, exatidão e precisão (repetibilidade de injeções, precisão intra-dia e entre-dias). A 2ª fase consistiu em um estudo comparativo entre a CFH em tecido hepático bovino fresco liofilizado e tecido conservado em parafina; os fragmentos foram obtidos por biópsias “em cunha”. As análises bioquímicas foram realizadas por espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer, modelo Analyst-300, com forno de grafite.

Os resultados observados mostraram uma excelente linearidade do método para a faixa de concentração entre 20 e 120 ppb, obtendo-se um coeficiente de determinação médio de 0,99. O desvio-padrão relativo (DPR) foi inferior a 15% para a exatidão, e inferior a 10% para a precisão entre-dias e para a precisão intra-dia. A precisão da repetibilidade de injeções foi 0,65%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os valores da CFH nos grupos de tecido hepático fresco e de tecido conservado em parafina ($p=0,2$).

Os achados do presente estudo permitem concluir que a quantificação de ferro no tecido hepático encontra-se validada, e que é possível realizar este método utilizando tecido hepático bovino fresco liofilizado. Além disso, a comparação entre a CFH em fragmentos de tecido hepático fresco e em amostras desparafinadas permite concluir que o método pode ser utilizado de forma confiável e reprodutível para a quantificação de ferro hepático em amostras estocadas em bloco de parafina.

SUMMARY

Determination of hepatic iron concentration (HIC) has important diagnostic and research implications on iron overload states. Atomic absorption spectroscopy (AAS) is considered the method of choice, and it is only available in selected institutions. Usually, measurement of hepatic iron content is performed on fresh tissue. An important practical issue is the possibility to use paraffin-embedded tissue for this purpose.

The objectives of this study were to validate hepatic iron quantitation by AAS at our setting in Brazil, and to compare HIC between fresh and paraffin-embedded tissue. The study was performed in two different phases. First, method validation was performed using the *National Institutes of Standards & Technology* standard reference material 1577b (bovine liver), following the guidelines of the *International Conference on Harmonization* (ICH). Bioanalytical procedures were performed to evaluate linearity, precision and accuracy. Biochemical analysis were performed at a Perkin-Elmer spectrometer, model Analyst-300, with graphite-furnace. In the second phase of the study, surgical biopsy samples were obtained from bovine liver and divided in two different groups (fresh tissue or paraffin-embedded tissue) for further measurement of hepatic iron content.

We found an excellent correlation on the method's linearity for the concentration range between 20 and 120 parts per billion (ppb) - average $r^2 = 0,99$. The relative standard deviations (RSD) were bellow 15% for accuracy, and below 10 % for both day-to-day reproducibility and within-days precision. HIC values were

similar in both fresh and deparaffinized tissue, as analysed by paired Student's t Test ($p=0,2$).

We conclude that the determination of HIC by AAS was validated by the present study, and that it is possible to perform iron quantitation on fresh bovine liver tissue. Comparative analysis also suggest that accurate hepatic iron quantitation of deparaffinized liver tissue is possible at our setting.

1. INTRODUÇÃO:

1.1 FERRO: ASPECTOS GERAIS E METABOLISMO

O ferro é um dos metais mais abundantes na crosta terrestre. É considerado essencial para o funcionamento do organismo humano, e para todos os seres vivos que habitam ambientes ricos em oxigênio. Consiste em um elemento fundamental de diversas reações enzimáticas (entre elas, os citocromos da cadeia respiratória), devido à sua capacidade em fornecer e captar elétrons com facilidade. A sua afinidade de ligação com o oxigênio, através do grupo heme da hemoglobina, facilita o transporte desta molécula em meios aquosos e a sua distribuição para os tecidos¹⁻⁷.

A quantidade total de ferro corporal em indivíduos adultos saudáveis varia de 3 a 5 gramas, a maior parte constituindo moléculas de hemoglobina. Cerca de 0,1 % do total encontra-se na circulação sanguínea ligado à transferrina, a qual é sintetizada pelo fígado. Esta proteína é importante no intercâmbio de ferro entre o plasma e as células precursoras da linhagem eritróide, um fenômeno que representa cerca de 80 % da reciclagem do ferro plasmático. A maior parte do ferro armazenado no organismo encontra-se sob a forma de ferritina e hemossiderina, predominantemente nos tecidos hepático e muscular, e nas células do sistema reticuloendotelial. Em homens saudáveis, estima-se que as reservas de ferro correspondam a cerca de 800 mg, o que difere da quantidade apresentada por mulheres (aproximadamente 300 mg em pré-menopáusicas, aumentando para cerca de 600 mg na fase pós-menopáusicas)^{1,4,6,7}. A distribuição do ferro no organismo é influenciada por estados de sobrecarga e deficiência,

sendo que a sua homeostase é regulada pela absorção intestinal, mais especificamente no duodeno. O ferro é eliminado do organismo através da descamação de células epiteliais cutâneas e mucosas dos tratos gastrointestinal, biliar e geniturinário, além da menstruação. Quando em excesso, o ferro é acumulado predominantemente no fígado, e em estágios mais avançados de sobrecarga, também nos miócitos cardíacos e células acinares pancreáticas, entre outros tecidos ^{1,3-8}.

O ferro da dieta pode apresentar-se sob a forma iônica ou não-iônica (heme), as quais possuem particularidades distintas quanto à sua absorção no organismo. O ferro iônico pode estar presente na forma reduzida (ferroso) ou oxidada (férico), sendo que a maior parte do ferro existente no meio ambiente encontra-se sob a forma iônica trivalente (Fe^{+3}), que é muito pouco solúvel em meios aquosos em pH neutro. O primeiro passo para a sua captação pelas células é a reação de redução deste íon, que ocorre através da enzima Dcytb (citocromo duodenal B), localizada na borda em escova da mucosa duodenal. Outros mecanismos envolvidos na absorção de ferro são o seu transporte intra-celular pelo DMT1 (transportador de metais bi-valente 1), e a posterior passagem para a corrente sanguínea através de uma proteína da membrana basolateral do enterócito, chamada ferroportina ^{1,4,5,7,8}, conforme ilustrado na [figura 1](#). Este processo de absorção do ferro é regulado por diversos fatores, como os níveis das reservas corporais de ferro, o ritmo de eritropoiese e a hipóxia. Entre os possíveis mecanismos envolvidos nesta regulação, parecem estar envolvidos também o receptor de transferrina 1 (TRF 1, que capta o ferro ligado à transferrina), a

proteína HFE, a proteína reguladora do ferro citosólico (IRP) e o elemento regulador do ferro (IRE) ^{5,7}.

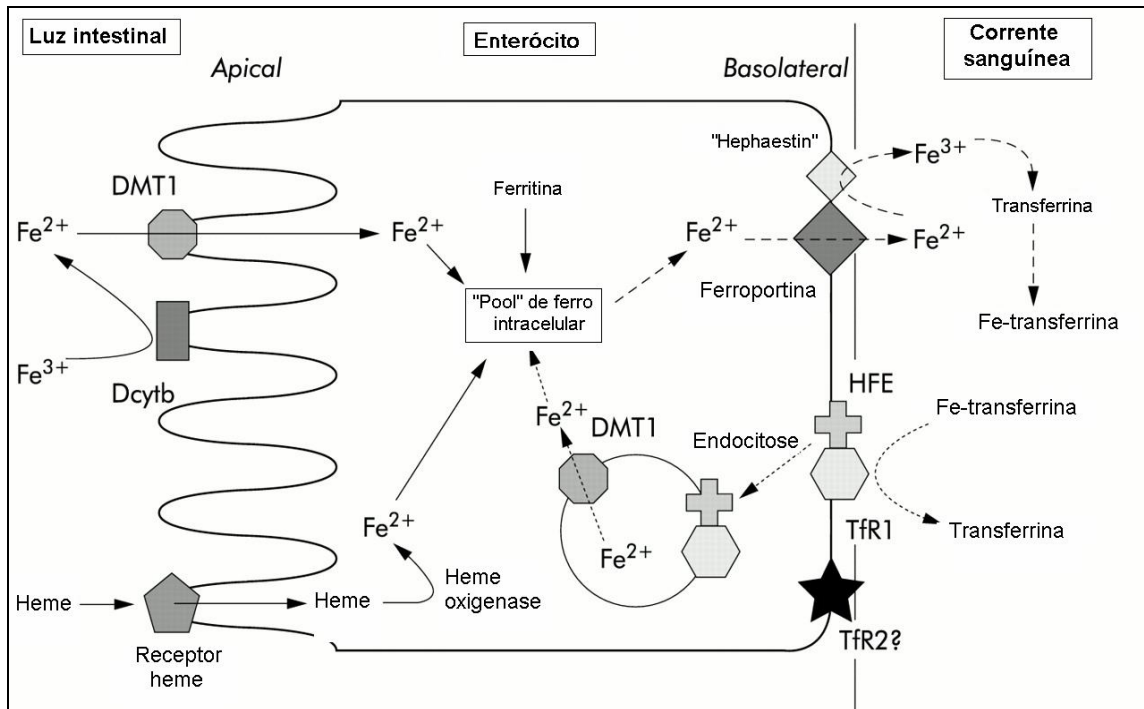


Figura 1 – Um modelo das vias de absorção do ferro pelo enterócito. Adaptada a partir de Trinder, D. ⁷.

1.2 HEPATOTOXICIDADE DO FERRO

A despeito de sua importância fundamental para as células, o ferro também pode exercer efeitos extremamente tóxicos ^{1,6,7,9}. O estado de equilíbrio do ferro no organismo humano é mantido por três “sistemas proteicos” com funções distintas:

- transferrina: transporta o íon em seu estado férrico na corrente sanguínea, tornando-o solúvel e não tóxico.
- ferritina: acumula ferro em excesso no compartimento intracelular, mantendo-o em um estado quimicamente inerte.

- proteínas reguladoras de ferro (IRP): envolvidas na regulação da captação e no armazenamento celular do ferro, a partir de variações da sua concentração no organismo.

A toxicidade pelo ferro ocorre quando estes sistemas de defesa são superados pelo acúmulo do metal. Esta sobrecarga pode determinar lesão celular, com conseqüente comprometimento da função dos órgãos e tecidos, e o desencadeamento de eventos carcinogênicos ^{1,5-7,9-12}.

A primeira conseqüência da sobrecarga de ferro no organismo é o seu acúmulo na corrente sanguínea ^{6,7}. Uma vez saturada a capacidade de ligação da transferrina plasmática ao ferro, a quantidade excedente do metal é transportada por componentes de baixo peso molecular, sendo chamado de *ferro não ligado à transferrina* (NTBI – “non transferrin bound iron”), o qual é capaz de catalizar reações envolvendo a liberação de radicais livres. A maior parte do *ferro não ligado à transferrina* circula sob a forma férrica, sendo captado avidamente pelos hepatócitos como forma de remover da circulação um componente altamente tóxico. Analogamente a este processo, no meio intracelular, o ferro “livre”, chamado de carga de ferro lábil (LIP – “labile iron pool”), que consiste no ferro ligado a componentes de baixo peso molecular, possui atividade catalítica capaz de desencadear reações de formação de radicais livres. Em estados de sobrecarga de ferro, o equilíbrio entre o LIP e o ferro armazenado sob a forma de ferritina é prejudicado, de forma que o excesso de LIP determina toxicidade e lesão celular ^{7,9}. Isso ocorre através da disfunção de enzimas no citosol e nas mitocôndrias.

De maneira geral, a toxicidade do ferro é decorrente da sua capacidade de participar de reações do tipo oxidação-redução. O dano oxidativo celular provocado pelo ferro pode acometer alvos estruturais distintos, como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos ^{3,4,7,9,13}. Os mecanismos de lesão mais estudados são os relacionados à peroxidação lipídica, desencadeada através de uma série de reações que levam à formação de radicais livres (como radicais hidroxila, entre outros), determinando lesão das membranas celulares. O acometimento de organelas, tais como mitocôndrias, microsomas e lisossomas, pode desencadear disfunção celular (figura 2).

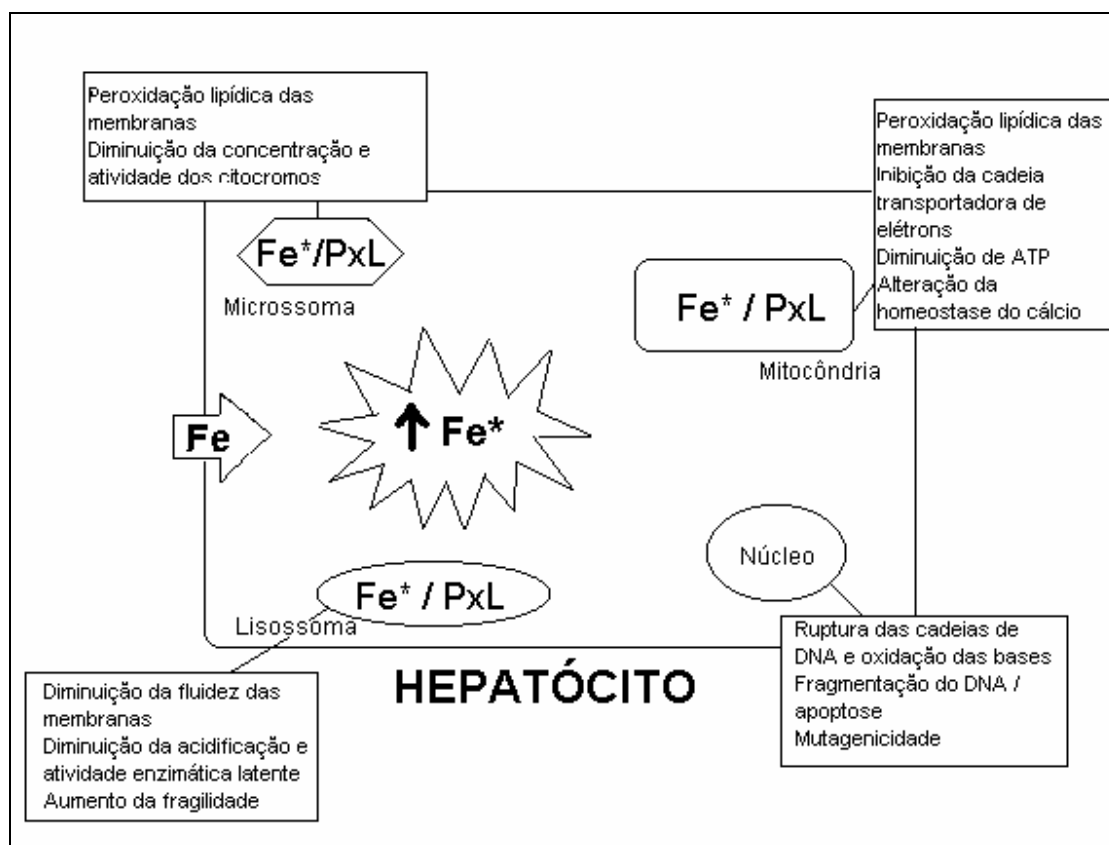


Figura 2 – Mecanismos de toxicidade por ferro; ênfase sobre o papel da lesão sobre as organelas. Adaptada a partir de Pietrangelo, A. ⁹.

Uma importante consequência da toxicidade do ferro sobre os hepatócitos é o desencadeamento de fibrogênese. Há duas hipóteses principais relacionadas à fibrogênese progressiva associada à sobrecarga de ferro ^{7,9}. A primeira, considera que os hepatócitos liberam diretamente substâncias pró-fibrogênicas que ativam as células hepáticas estreladas ou células de Ito, principal fonte de colágeno e outras proteínas da matriz nas hepatopatias crônicas. A segunda hipótese sugere que os hepatócitos liberam substâncias que estimulam as células de Kupffer, as quais, por sua vez, seriam responsáveis pela produção das substâncias ativadoras das células de Ito. Outro mecanismo envolvido neste fenômeno está relacionado aos produtos da peroxidação lipídica, que estimulariam as células de Kupffer a produzirem fator- β transformador de crescimento ou outras substâncias pró-fibrogênicas, determinando a ativação das células de Ito. Um estudo italiano, de Farinati e colaboradores, demonstrou que o ferro em excesso no fígado humano desencadeia lesão oxidativa, promovendo a peroxidação lipídica e a ativação de citocinas, e resultando em fibrose e cirrose hepática ¹⁴.

Além dos fenômenos de lesão celular e fibrogênese do parênquima hepático, é importante considerar também o efeito da sobrecarga de ferro sobre o potencial desenvolvimento de hepatocarcinoma ^{3,6,7,11,12}.

1.3 HEPATOPATIA ASSOCIADA À SOBRECARGA DE FERRO

O aumento da deposição de ferro no tecido hepático pode estar associado ao desenvolvimento de hepatopatia crônica em muitos pacientes. O termo hemossiderose tem sido utilizado, classicamente, como sinônimo da presença de

ferro em excesso no fígado (independentemente das características de sua distribuição no tecido), representando um grande grupo de condições clínicas associadas com este tipo de sobrecarga. Na realidade, os chamados estados de sobrecarga de ferro consistem em uma série de entidades que se caracterizam, de um modo geral, pelo envolvimento do fígado (e de outros órgãos) na deposição de ferro em excesso no organismo. Do ponto de vista prático, os estados de sobrecarga de ferro podem ser classificados em primários (como a hemocromatose hereditária) e secundários (como hepatopatia alcoólica, estados pós-transfusionais, algumas doenças hematológicas, hepatites virais crônicas e esteato-hepatite não alcoólica) – vide quadro 1.

Quadro 1 – Classificação dos estados de sobrecarga de ferro. Adaptada a partir de Trinder, D.⁷

| |
|---|
| Formas hereditárias ou familiares de hemocromatose |
| Hemocromatose hereditária (HH, HFE1) |
| homozigose C282Y |
| heterozigose composta C282Y/H63D |
| outras mutações do gene HFE |
| Hemocromatose juvenil (HFE2) |
| Mutação do TRF-2 <i>receptor 2 da transferrina</i> (HFE3) |
| Mutação da ferroportina (HFE4) |
| Aceruloplasminemia |
| Atransferrinemia |
| Sobrecarga de ferro neonatal |
| Hemocromatose hereditária autossômica (Ilhas Salomão) |
| Formas adquiridas de sobrecarga de ferro |
| Anemias associadas à sobrecarga de ferro |
| Talassemia |
| Anemia sideroblástica |
| Anemia hemolíticas crônicas |
| Sobrecarga de ferro da dieta |
| Sobrecarga de ferro associada à hepatopatia crônica |
| Hepatite B |
| Hepatite C |
| Hepatopatia alcoólica |
| Esteatohepatite não-alcoólica |
| Porfiria cutânea tarda |

A determinação da causa específica da sobrecarga pode apresentar importantes implicações quanto ao prognóstico e ao tratamento de pacientes, assim como em relação ao aconselhamento genético de familiares potencialmente afetados. A investigação diagnóstica dos estados de sobrecarga de ferro deve, necessariamente, considerar a hipótese de hemocromatose hereditária ¹⁵.

A hemocromatose hereditária (HH) é uma das doenças genéticas mais prevalentes em populações de indivíduos caucasianos, com padrão de transmissão autossômico recessivo ^{3,4,8,16-19}. Caracteriza-se por um envolvimento multissistêmico, em consequência da absorção intestinal aumentada de ferro, e pela sua deposição tecidual progressiva, causando danos irreversíveis e disfunção em diferentes órgãos (fígado, pâncreas, coração, entre outros). O diagnóstico da HH depende de um alto índice de suspeição clínica. A presença de manifestações clínicas e/ou história familiar sugestivas, associadas a alterações laboratoriais compatíveis com sobrecarga de ferro (elevação dos níveis séricos de ferritina, e sobretudo de saturação da transferrina), presença de achados histopatológicos característicos, e elevada concentração de ferro no tecido hepático, são sugestivos de HH ^{3,4,8,17}. Atualmente, um importante elemento na confirmação do diagnóstico é a detecção da presença de mutações do gene HFE. Em algumas situações clínicas, entretanto, não é possível excluir esta hipótese diagnóstica mesmo na ausência das principais mutações ^{8,16,17,19-21}. De acordo com Pietrangelo, considera-se, atualmente, que outras mutações e também outros genes estejam envolvidos nas bases genéticas desta doença ²². Estas alterações genéticas estão relacionadas à codificação de proteínas envolvidas na

homeostase do ferro, como a proteína HFE, o receptor da transferrina-2 e a hepcidina ^{23,24}.

Apesar das alterações genéticas estarem presentes desde o nascimento, a apresentação clínica da HH dependerá de um processo cumulativo de deposição de ferro nos órgãos-alvo. A morbi-mortalidade está diretamente associada com o aparecimento dos sintomas e complicações da doença. O estabelecimento do diagnóstico e, conseqüentemente, a implementação da terapêutica em estágios mais precoces oferecem potenciais benefícios, como a prevenção de complicações crônicas (como cirrose, hepatocarcinoma, diabete *mellitus* e insuficiência cardíaca) e o aumento da sobrevida dos pacientes ^{10,17,19,25}.

Observa-se que, independentemente da causa da sobrecarga de ferro, a deposição excessiva deste metal no parênquima hepático está diretamente relacionada ao dano tecidual, com desenvolvimento de lesão hepatocelular, fibrogênese e evolução para cirrose ¹¹.

A história natural da HH pode ser influenciada por co-fatores intrínsecos (como idade, **sexo** e fatores genéticos), e extrínsecos ou ambientais (como obesidade, consumo de álcool e infecção pelos vírus B ou C)¹⁶. Existem fortes evidências que a ingestão alcoólica crônica e a hepatite crônica pelo vírus C podem potencializar o dano hepático da sobrecarga de ferro, determinando doença hepática mais precocemente (em pacientes mais jovens e com menores índices de ferro hepático) ^{26,27}.

Outro importante aspecto do estudo das hepatopatias associadas à sobrecarga de ferro é a possível relação entre marcadores séricos e teciduais desta sobrecarga com a evolução clínica de pacientes com hepatites crônicas, em

especial, a hepatite crônica pelo vírus C. Apesar dos mecanismos fisiopatológicos da deposição de ferro não estarem completamente esclarecidos, há evidências de uma maior frequência de sobrecarga de ferro em pacientes com hepatites virais crônicas ²⁸. Giannini e colaboradores sugeriram, inclusive, que a sobrecarga de ferro pode influenciar a história natural da hepatite crônica pelo vírus C, estando associada com um aumento na frequência da progressão para cirrose ²⁹. Além disso, o ferro também pode ser um fator associado a uma resposta menos favorável ao tratamento antiviral com interferon para a hepatite C, conforme sugerido por Fontana e colaboradores ³⁰, e Bonkovski ³¹.

1.4 DIAGNÓSTICO CLÍNICO E LABORATORIAL DA SOBRECARGA DE FERRO

Os estados de sobrecarga de ferro, primários ou secundários, podem apresentar-se de forma indistinguível, tanto pela sua apresentação clínica, quanto em relação aos exames complementares.

A realização de biópsia hepática era considerada indispensável para o diagnóstico da HH e, ainda hoje, constitui-se em um importante recurso diagnóstico na investigação da sobrecarga de ferro. Através deste procedimento, pode ser obtido material tanto para a realização de exame anatomopatológico, quanto para análise bioquímica, com a determinação da concentração de ferro hepático (CFH – medida em $\mu\text{M/g}$ ou $\mu\text{g/g}$ de peso seco), e o respectivo cálculo do índice de ferro hepático (IFH – que representa a CFH dividida pela idade do paciente) ³². O quadro 2 ilustra, esquematicamente, o cálculo do índice de ferro

hepático, e a tabela 1 expressa os valores considerados normais e anormais da CFH.

Quadro 2 - Fórmula do Índice de ferro hepático (IFH): concentração de ferro hepático* (CFH) dividida pela idade do paciente.

* se CFH em µg/g, é necessário multiplicar a idade por 55,8.

$$\text{IFH} = \frac{\text{CFH } (\mu\text{mol/g de tecido seco})}{\text{Idade do paciente}} \quad \text{ou} \quad \frac{\text{CFH } (\mu\text{g/g de tecido seco})}{(55,8 \times \text{Idade})}$$

Tabela 1 - Limites da concentração de ferro hepático (em µmol/g e µg/g) na ausência e na presença de sobrecarga de ferro. Adaptada do relatório da Associação Européia para Estudos do Fígado – Conferência Internacional de Consenso sobre Hemocromatose 2000¹⁶ e conforme dados publicados por Ludwig³³.

| | CFH (µmol/g) | CFH (µg/g) |
|---|--------------|------------|
| Normal (Homens) | 7,2 – 39,4 | 400 – 2200 |
| Normal (Mulheres) | 1,8 – 28,7 | 100 – 1600 |
| Sobrecarga Fe ⁺⁺ (leve) | > 30 | > 1700 |
| Sobrecarga Fe ⁺⁺ (moderada) | > 100 | > 5600 |
| Sobrecarga Fe ⁺⁺ (acentuada) | > 200 | > 11200 |

Além da utilização de fragmentos de tecido hepático fresco obtidos por biópsias, também é possível utilizar material estocado em blocos de parafina para a quantificação de ferro no tecido hepático³⁴⁻³⁷. Índices tais como IFH igual ou superior a 1,9 foram descritos como critérios diagnósticos de HH, permitindo a sua

diferenciação de estados de sobrecarga secundária de ferro ³⁸⁻⁴⁴. Estes parâmetros foram, originalmente, descritos através de estudos que envolviam pacientes com hemocromatose e hepatopatia alcoólica, e tiveram, posteriormente, a sua utilização extrapolada para outras causas de hepatopatia associada à sobrecarga secundária de ferro. É importante ressaltar, no entanto, que a aplicação destes índices tem sido bastante questionada, sobretudo quando da avaliação de pacientes em fase cirrótica avançada ^{33,42,45-47}.

O exame anatomopatológico, por sua vez, permite identificar os depósitos de ferro através de colorações especiais, como o azul da Prússia, ou a coloração de Perls. É possível, também, avaliar de forma semi-quantitativa o grau de sobrecarga de ferro, além da sua distribuição tecidual ^{32,48-52}. Outra importante característica do exame anatomopatológico é a sua capacidade de determinar o estadiamento da doença, ou seja, o grau de fibrose. Por outro lado, algumas limitações deste método referem-se aos seguintes fatores: avaliar o ferro sob a forma de hemossiderina, não contemplar a idade do paciente, e apresentar menor precisão que a determinação bioquímica da CFH ^{10,51-55}.

Os achados histopatológicos podem auxiliar no diagnóstico diferencial das hepatopatias associadas à sobrecarga de ferro nas suas fases iniciais. Na sobrecarga secundária de ferro, caracterizam-se pela distribuição do metal predominantemente nas células de Kupffer, enquanto que na HH isto ocorre principalmente no parênquima hepático ^{11,50,51}. No entanto, na cirrose avançada, a dificuldade em distinguir estas duas condições pode persistir mesmo diante dos achados histopatológicos. Sugere-se que o estágio avançado da cirrose, por si só,

esteja relacionado a outros mecanismos que determinam o acúmulo de ferro ^{33,46,56-58}.

Outros métodos diagnósticos foram pesquisados com o objetivo de avaliar a sobrecarga de ferro hepático de forma não invasiva e indireta. A tomografia computadorizada e, principalmente, a ressonância nuclear magnética vem sendo estudadas como alternativas para avaliar quantitativamente a sobrecarga de ferro hepático ^{59,60}. A ressonância magnética apresenta características que lhe conferem perspectivas bastante promissoras quanto à sua utilização na investigação da sobrecarga de ferro no fígado, e também em outros órgãos, como coração e cérebro ⁶¹.

1.4.1 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO NO TECIDO HEPÁTICO - ESPECTROSCOPIA POR ABSORÇÃO ATÔMICA

A quantificação de metais no tecido hepático consiste em um importante recurso diagnóstico em Hepatologia. A elevação da concentração hepática de certos metais, como o ferro na hemocromatose hereditária e nos estados de sobrecarga secundária de ferro, e o cobre na doença de Wilson, possui implicações no diagnóstico destas entidades mórbidas ^{8,18,62}. Entre os métodos disponíveis para determinar a concentração de metais no fígado, os principais são a espectroscopia por absorção atômica e a colorimetria ^{32,48,52,63,64}.

A espectroscopia por absorção atômica consiste em um método analítico que permite quantificar metais em tecidos ou fluidos biológicos, e é considerada o método de escolha para a quantificação de metais em tecido hepático ^{32,34,36,37,43,64-67}. Através deste método, os átomos de uma determinada amostra,

quando excitados por uma fonte de energia luminosa específica, absorvem energia em um determinado comprimento de onda. O uso de fontes de luz especiais e a seleção de comprimentos de onda específicos permitem a determinação de elementos químicos específicos na amostra analisada. A absorção é proporcional ao número de átomos excitados presentes no percurso óptico. Medindo a quantidade de luz absorvida, é possível determinar quantitativamente a concentração de um determinado metal. Um sistema de forno de grafite ou chama (formada pela mistura de determinados gases) é acoplado ao espectrofotômetro de absorção atômica, com a função de converter a amostra em vapor atômico que, então, é submetido à absorção da energia luminosa emitida pela fonte do aparelho. A leitura da absorvância da amostra é realizada por um programa de computador, medida inicialmente em unidades de absorvância e, posteriormente, convertida para a unidade desejada, como microgramas por grama ou partes por milhão (ppm) ⁶⁶.

Apesar de ter sido desenvolvido há várias décadas, a disponibilidade desse método em nosso meio tem sido pouco divulgada ^{68,69}. O primeiro passo para a utilização da espectroscopia por absorção atômica em pesquisa e investigação clínica é a sua validação.

1.4.2 VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA

A validação de um método bioanalítico consiste na avaliação, através de procedimentos laboratoriais específicos, de que as características do método estão adequadas e são confiáveis para as aplicações analíticas propostas.

Existem diretrizes bem definidas para a validação de uma metodologia analítica, como a elaborada a partir da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use - ICH* ^{70,71} (reunião de consenso entre Comunidade Européia, Estados Unidos e Japão), assim como as normas do *Food and Drug Administration – FDA*, órgão regulador norte-americano ⁷², e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, no Brasil ⁷³. Estas diretrizes determinam procedimentos a serem seguidos, com vistas a demonstrar que o método utilizado para a análise quantitativa de um certo material, em uma determinada matriz biológica, é confiável e reprodutível para o objetivo proposto.

Os principais parâmetros analíticos que devem ser avaliados estão listados a seguir:

- **Especificidade:** representa a capacidade de um método analítico identificar, de forma inequívoca, a substância em exame na presença de componentes que poderiam interferir na sua determinação, tais como excipientes, impurezas e produtos de degradação. É permitido submeter as amostras a condições de degradação para avaliação da influência dos produtos de degradação na especificidade. É importante mencionar que a falta de especificidade de um método analítico pode ser compensada através da análise paralela por outro método;

- **Exatidão:** representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método com os valores aceitos como referência. A exatidão pode ser expressa como o percentual de resposta obtido através do ensaio de uma quantidade da substância

de pureza conhecida (substância química de referência), incorporada em um meio de composição definida;

- Precisão: representa o grau de concordância entre os resultados de análises individuais, quando o método é aplicado diversas vezes em uma mesma amostra homogênea, em idênticas condições de testes. A precisão pode ser medida através da repetibilidade, da precisão intermediária e da reprodutibilidade. A repetibilidade é efetuada através de várias análises nas mesmas condições e em curto intervalo de tempo. Esta determinação deve ser feita a partir de um mínimo de nove determinações, contemplando o limite de variação do método, ou seja, três concentrações (baixa, média e alta), com três réplicas cada, ou a partir de um mínimo de seis determinações a 100% da concentração teste. A precisão intermediária expressa o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias, analistas ou equipamentos. A reprodutibilidade se refere ao uso do procedimento analítico em diferentes laboratórios, como parte de um estudo colaborativo;

- Linearidade: corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame, dentro de uma determinada variação. A expressão gráfica deste parâmetro é feita através de curvas de calibração, que ilustram a relação entre a resposta do instrumento frente a concentrações pré-determinadas do substrato em análise. Recomenda-se utilizar um mínimo de cinco concentrações. Deve-se apresentar as curvas obtidas, o coeficiente de correlação linear e o intercepto da reta. O estudo da linearidade do método permite definir também os seguintes parâmetros:

- Faixa de Concentração: representa o intervalo entre a menor e a maior

concentração que pode ser medido com exatidão e precisão;

- Limite de detecção: representa a menor concentração do componente em análise na amostra, que pode ser detectado com confiabilidade, mas não necessariamente quantificado como um valor exato (é definido como 3 vezes a altura média do ruído de base produzido pelo equipamento);
- Limite de quantificação: representa a menor concentração de um componente na amostra que pode ser quantitativamente determinado, assegurando exatidão e precisão (é definido com 10 vezes a altura média do ruído de base produzido pelo equipamento);

Cabe destacar que os protocolos de validação devem ajustar-se de acordo com o contexto específico do método analítico em estudo.

Um importante elemento no processo de validação é a utilização de um padrão de referência do analito a ser quantificado. Desta forma, é possível preparar soluções com concentrações conhecidas do substrato e realizar ensaios para a quantificação de uma concentração conhecida *a priori*. Devem ser fornecidas informações quanto à fonte e o respectivo número do lote, data de validade, certificados de análises e/ou identificação do grau de pureza⁷⁰⁻⁷².

1.5 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO:

Apesar de descrita na literatura há algumas décadas³², a quantificação de ferro hepático através da espectroscopia por absorção atômica tem sido pouco divulgada nos dias atuais, e a sua disponibilidade em nosso meio é bastante

restrita ^{68,69}. A realização do presente estudo justifica-se devido à necessidade da adequada validação deste método analítico em nosso meio.

Considerando, também, que a utilização de tecido hepático conservado em parafina para a quantificação de ferro representa um importante recurso diagnóstico na prática clínica ^{34,36,43}, julga-se ser de interesse comparar a concentração de ferro hepático em tecido hepático fresco e naquele conservado em parafina.

2. OBJETIVOS

2.1 Desenvolver e validar um método analítico para determinar a concentração de ferro em tecido hepático bovino através da espectroscopia por absorção atômica.

2.2 Avaliar a eficiência da obtenção, extração e preparação das amostras de fígado bovino.

2.3 Determinar a concentração de ferro em tecido hepático bovino fresco liofilizado e em tecido submetido ao processo de conservação em parafina, avaliando comparativamente a quantificação de ferro nos dois tipos de processamento das amostras.

3. MATERIAIS E MÉTODO

A pesquisa foi desenvolvida através da realização de dois estudos. Primeiramente, foram feitos ensaios para a validação do método de quantificação de ferro no tecido hepático através da espectroscopia por absorção atômica, utilizando padrão adquirido do *National Institute of Standards and Technology* – NIST (Gaithersburg, MD, E.U.A.). Uma vez validado o método, procedeu-se, na etapa seguinte, com a realização de um estudo para comparar a CFH entre tecido hepático fresco e tecido conservado em parafina. A metodologia é descrita, a seguir, de acordo com as respectivas fases de execução do projeto.

Foi desenvolvido um projeto de caráter multidisciplinar, abrangendo vários setores vinculados à Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS):

- Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS), da Faculdade de Farmácia da UFRGS;
- Laboratório de Hepatologia Experimental – Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA);
- Laboratório de Patologia – Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA);
- Serviço de Patologia do HCPA;
- Banco de Ossos do HCPA.

3.1 MATERIAIS

Os equipamentos e materiais empregados no estudo foram os seguintes:

- Solução padrão de ferro (Titrisol - Merck®) 1 mg/ml *
- Padrão de referência de ferro em fígado bovino (*National Institute of Standards and Technology* - standard reference material 1577b)*
- Fígado bovino **
- Purificador de água ultrapura Milli-Q Plus (Millipore®)*
- Reagentes
- Pipetas
- Tubos tipo eppendorf
- Ácido nítrico, grau p.a*
- Banho de ultra-som Thornton® (modelo T50)*
- Estufa Biomatic® (modelo 303)*
- Agulha para biópsia hepática – “tru-cut”® (*automatic cutting needle, 16GA, TWX20, notch 17mm*)
- Bisturi cirúrgico de aço
- Liofilizador Edwards® Micro Moduli 97 ***
- Solução de formalina 10% ****
- Parafina ****
- Xileno ****
- Álcool 99% ****
- Espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer®, modelo Analyst

300, com forno de grafite acoplado (modelo HGA 800) e amostrador automático (modelo AS-72)*

* disponíveis no Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) da Faculdade de Farmácia da UFRGS.

** adquirido no comércio local (açougue)

*** disponível no Banco de Ossos do HCPA..

**** disponíveis no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA.

3.2 MÉTODO

3.2.1 DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA ANALÍTICA PARA QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO

3.2.1.1 Curvas de calibração com solução padrão de ferro e ensaios para a validação do método com padrão de referência de ferro para fígado bovino

Utilizando uma solução-padrão de ferro com concentração de 1 mg/ml, foram feitas diluições e obtidas amostras com diferentes concentrações, submetidas à análise através de espectroscopia por absorção atômica com forno de grafite. O resultado de cada experimento foi expresso através de uma curva de calibração, onde o eixo horizontal representa as crescentes concentrações da solução, e o vertical representa a área definida pela absorvância . A partir da realização de 9 curvas de calibração, foram determinados a faixa de concentração e os respectivos limites de detecção e de quantificação do método.

A próxima etapa envolveu a utilização de um padrão internacional de ferro para tecido hepático bovino (NIST; concentração de $184 \pm 15 \mu\text{g/g}$)⁷⁴. Durante a validação, foi aceito o valor de $184 \mu\text{g/g}$ como sendo a concentração real de ferro na amostra. A validação do método para tecido hepático consistiu na realização dos ensaios com amostras do material, a partir de diretrizes definidas pela ICH, FDA e ANVISA⁷⁰⁻⁷³. Esta etapa permitiu avaliar a exatidão e a precisão, além de confirmar os resultados obtidos com a solução-padrão de ferro.

Uma vez validado o método, a fase seguinte consistiu na utilização de fragmentos de tecido hepático bovino liofilizado para a determinação da concentração de ferro hepático (CFH) por espectrofotômetro de absorção atômica com forno de grafite. As amostras foram obtidas através de biópsias com agulha “tru-cut”. O tamanho dos fragmentos correspondeu ao tamanho aproximado das amostras obtidas em biópsias de tecido hepático humano. Os fragmentos foram transferidos para tubos eppendorf previamente descontaminados, tratados com ácido nítrico bi-destilado, sendo, posteriormente, levados ao ultra-som durante 1 hora e, na seqüência, colocados em estufa por 1 hora sob a temperatura de 60°C , para ocorrer dissolução. Uma alíquota de $50 \mu\text{l}$ de amostra devidamente solubilizada foi transferida para os frascos plásticos do amostrador automático, completando-se o volume até o total de 1 ml com água ultrapura. Esta solução final foi analisada.

3.2.1.2 Parâmetros analíticos:

A validação do método foi avaliada de acordo com seguintes parâmetros analíticos:

- Linearidade: avaliada pela realização de nove curvas de calibração, com seis níveis de concentração em cada uma delas; a equação da reta de regressão e os coeficiente de correlação de Pearson (r) e o coeficiente de determinação (r^2) foram determinados.
- Precisão: determinada através da repetibilidade de injeções, precisão intra-dia (seis medidas para cada faixa de concentração) e entre-dias (considerando dois dias de experimentos).
- Exatidão: determinada através da realização de um total de dezoito medidas (seis para cada faixa de concentração) de amostras do padrão NIST.
- Faixa de Concentração: selecionada a partir do experimento de linearidade.
- Limite de Detecção: aceito como a menor concentração que produziu um sinal 3 vezes maior que o ruído de base, avaliado a partir da análise de um pico de absorção *versus* tempo, na menor concentração da curva de calibração.
- Limite de Quantificação: aceito como a menor concentração que produziu um sinal 10 vezes maior que o ruído de base.

3.2.1.3 Quantificação de ferro em amostras de tecido hepático bovino fresco

Foi realizado um experimento para a quantificação de ferro hepático em fragmentos de fígado bovino fresco. Foram realizadas biópsias com agulha “tru-

cut” de um único fígado, por médico radiologista intervencionista participante do estudo, de maneira semelhante à situação usual da prática clínica vigente no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As amostras obtidas foram colocadas em tubos tipo eppendorf, previamente submetidos a lavagem com ácido nítrico (para evitar potenciais fontes de contaminação) e conservadas a 80 °C negativos por, no máximo, 24 horas. A seguir, foram submetidas ao processo de liofilização para obtenção de tecido seco, durante cerca de 72 horas, até a estabilização do peso. A cada fragmento de tecido, foi adicionado 500µl de ácido nítrico concentrado (bidestilado) e submetido ao ultra-som por 1 hora. Posteriormente, os tubos eppendorf (fechados) contendo as amostras foram colocados em estufa a 60°C por 1 hora com o objetivo de solubilizá-las e destruir o material orgânico. De cada uma das soluções obtidas, foi transferido 50 µl para frascos plásticos do amostrador automático e completado o volume até 1 ml com água ultrapura, sendo então realizada a leitura da absorvância por espectrofotômetro de absorção atômica.

3.2.1.4 Critérios de exclusão:

Foi determinado que as amostras que apresentassem valores de CFH fora da faixa compreendida entre a média e mais ou menos dois desvios-padrão seriam excluídas.

3.2.1.5 Análise estatística:

As curvas de calibração para a avaliação da linearidade do método foram analisadas através do teste de regressão linear pelo método dos mínimos

quadrados; foram calculados o coeficiente de correlação linear de Pearson (r) e o coeficiente de determinação (r^2) para cada curva de calibração.

As variáveis quantitativas foram descritas através de medidas de tendência central e de dispersão. Os resultados da exatidão foram expressos através de porcentagem em relação ao valor teórico do teor de ferro do padrão NIST. Os resultados da precisão foram expressos como desvio padrão relativo (DPR).

A distribuição dos valores da quantificação de ferro em amostras de fígado bovino foi descrita através das respectivas média, mediana e desvio padrão. Foi calculado o intervalo de confiança para um nível de significância de 5%, correspondente à distribuição de noventa e cinco por cento dos valores encontrados (IC 95%).

3.2.2 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO HEPÁTICO EM TECIDO FRESCO E TECIDO SUBMETIDO À CONSERVAÇÃO EM PARAFINA

Após a aplicação do método validado em amostras de tecido hepático fresco, foi realizado um outro experimento com amostras de fígado bovino, para comparar a quantificação de ferro através da espectroscopia por absorção atômica em tecido hepático fresco e tecido submetido à conservação em parafina.

3.2.2.1 Coleta e processamento das amostras de tecido hepático

As amostras de tecido hepático bovino foram obtidas através de biópsias “em cunha” com bisturi de aço. Foi utilizado um fígado, sendo obtidos 30 fragmentos, divididos em pares, ou seja, um total de 60 fragmentos. Os

fragmentos de cada par foram divididos em 2 grupos, submetidos a processos distintos:

- grupo A (tecido hepático fresco): encaminhados diretamente para a liofilização e, posteriormente, para a determinação da CFH através da espectroscopia por absorção atômica.

- grupo B (tecido submetido à conservação em parafina): submetidos à fixação em solução de formalina 10% e inclusão em parafina, conforme procedimento padronizado para o processamento histológico; posteriormente, submetidos ao processo inverso (desparafinação), encaminhados para a liofilização e, após, para a determinação da CFH através da espectroscopia por absorção atômica.

O processo de armazenamento das amostras em blocos de parafina foi realizado no Laboratório de Patologia do Centro de Pesquisas do HCPA. As amostras foram submetidas à desidratação em álcool etílico, e à diafanização em banhos de xilol; na seqüência, foram incluídas em blocos de parafina.

O processo de desparafinação consistiu, inicialmente, na colocação das peças parafinadas em estufa a 60°C, por aproximadamente uma hora, para ocorrer a dissolução dos blocos. Posteriormente, foram realizados dois banhos de Xilol, com duração de 30 minutos cada, e dois banhos de álcool 99%, até a retirada da parafina.

Os fragmentos foram pesados em balança de precisão no Laboratório de Patologia Clínica do Centro de Pesquisas do HCPA. Na seqüência, foram submetidos ao processo de liofilização, com o objetivo de obter-se tecido seco para a posterior quantificação do metal.

A liofilização das amostras foi realizada no Banco de Ossos do HCPA, através de Liofilizador Edwards® Micro Moduli 97. Os fragmentos eram retirados do liofilizador para pesagem, a cada vinte e quatro horas, até que fosse constatada a estabilização do peso seco do tecido.

3.2.2.2 Tamanho amostral:

A partir de revisão da literatura^{34,36,37,43} e realização de cálculo de tamanho amostral (através do programa PEPI®, versão 3.0), estimou-se que para detectar-se uma diferença de pelo menos um desvio padrão nas medidas do teor de ferro entre os dois grupos, seriam necessários pelo menos dezessete pares de amostras de fígado bovino (total de 34 fragmentos, sendo metade para cada grupo). O cálculo de tamanho amostral considerou um nível de significância de 5% e um poder de 90%.

3.2.2.3 Quantificação de ferro

Os experimentos de quantificação de ferro (a partir de solução-padrão de ferro e tecido hepático bovino) foram realizados no Laboratório de Produção de Padrões Secundários (LAPPS) da Faculdade de Farmácia da UFRGS. Foi utilizado espectrofotômetro de absorção atômica Perkin-Elmer®, modelo Analyst

300, com forno de grafite acoplado (modelo HGA 800) e amostrador automático (modelo AS-72).

A figura 3 ilustra os procedimentos realizados nesta fase:

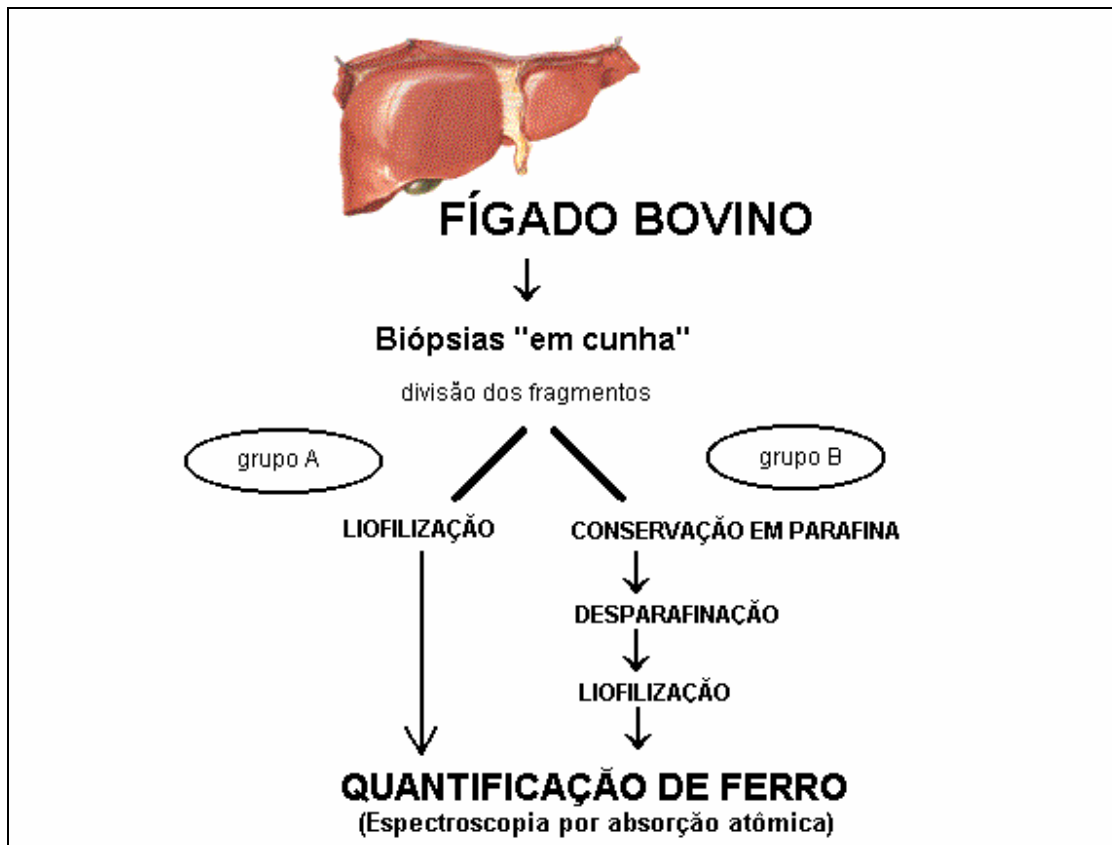


Figura 3 – Fluxograma da comparação da quantificação de ferro em tecido hepático fresco e submetido à conservação em parafina

3.2.2.4 Critérios de exclusão:

Foram excluídas da análise as amostras cuja CFH apresentava-se fora da faixa compreendida entre a média e mais ou menos dois desvios-padrão.

3.2.2.5 Análise estatística:

Foram utilizados os programas *Microsoft Excel for Windows*® (versão 2002) e *Statistical Package for Social Sciences*® (SPSS - versão 12.0), para a criação do banco de dados e a realização dos testes estatísticos, respectivamente. Para comparar a quantificação de ferro no tecido hepático fresco com a obtida em tecido submetido à conservação em parafina, foi utilizado o Teste t de Student para amostras emparelhadas. Foi determinado um nível de significância de 5% e um poder de 90%.

3.3 ASPECTOS ÉTICOS

Os experimentos foram realizados utilizando-se solução-padrão de ferro e padrão de referência de ferro para tecido hepático bovino certificados. O tecido hepático bovino fresco foi adquirido em estabelecimento comercial especializado (casa de carnes).

O projeto foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do HCPA, e aprovado em março de 2003 (sob o número 03/011).

4. RESULTADOS:

Os resultados estão descritos conforme a seqüência cronológica da sua realização no projeto, subdivididos em **Validação do método**, e **Quantificação de ferro em tecido hepático fresco e em tecido submetido à conservação em parafina**.

4.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Os resultados da validação estão apresentados de acordo com os parâmetros que representam:

4.1.1 Linearidade

A figura 4 mostra uma curva de calibração correspondente a um dos nove experimentos realizados para avaliar a linearidade. Os resultados indicam que o método apresenta uma excelente linearidade na faixa de concentração entre 20 e 120 partes por bilhão (ppb). O valor médio dos coeficientes de determinação encontrados nos 9 experimentos foi de 0,9948 ($DP \pm 0,0028$), variando de 0,9891 a 0,9979. Foi observada regressão linear da variável área (referente à absorvância) sobre a variável concentração. Isto significa que acréscimos nas concentrações de ferro acarretaram em progressivos aumentos da área, obedecendo uma equação de regressão linear.

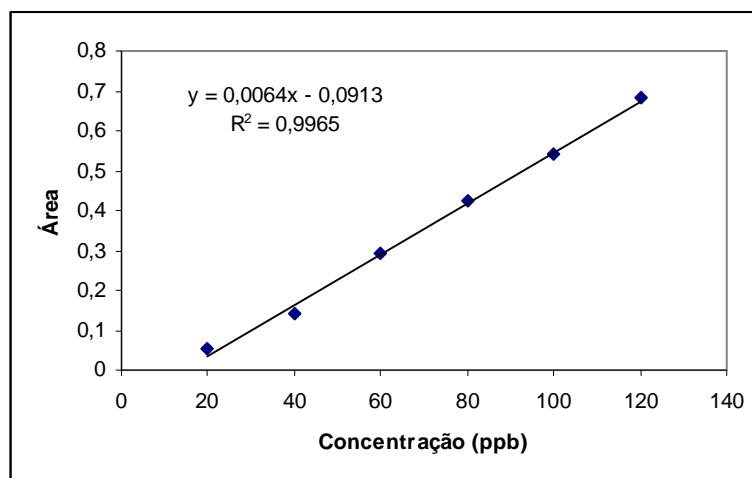


Figura 4 – Curva de calibração com uma solução-padrão de ferro: quantificação de ferro através de espectroscopia por absorção atômica (1º dia de experimento)

4.1.2 Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) encontrado foi de 2 partes por bilhão (ppb). O limite de quantificação (LQ) do método foi de 6 ppb. A [figura 5](#) ilustra, esquematicamente, como são determinados o LD e o LQ, a partir da análise de um pico de absorção (H2) de uma amostra de ferro em uma unidade de tempo. O LD corresponde à menor concentração que produziu um sinal 3 vezes maior que o ruído de base (H1) produzido pelo equipamento de absorção atômica, enquanto o LQ corresponde à concentração que representa 10 vezes a altura média do ruído de base.

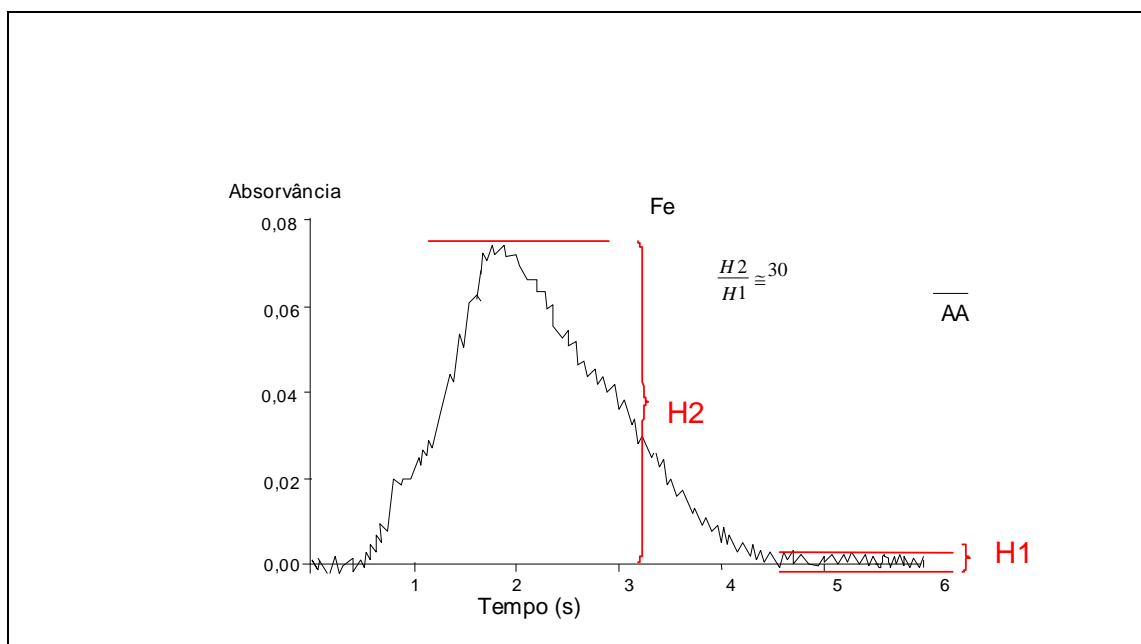


Figura 5 - Registro do pico de absorção (H2) versus tempo (em segundos) para uma amostra de ferro (padrão NIST) contendo 20 ppb de ferro (Fe), utilizada para determinar os limites de detecção e quantificação. O volume injetado foi 10 μ l.

H1=ruído de base.

4.1.3 Precisão

A avaliação da precisão intra-dia é ilustrada pelas tabelas 2 e 3, que correspondem à precisão equivalente a dois dias de experimentos. A partir de uma concentração de ferro conhecida, utilizando-se o padrão NIST, foram estudadas três faixas de concentração do metal (correspondendo, respectivamente, a 50, 75 e 110 partes por bilhão da amostra). Em cada dia, foram realizadas seis medidas para cada faixa de concentração, obtendo-se as médias, os desvios-padrão e os respectivos DPR.

Tabela 2 – Precisão intra-dia (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 1º dia de experimento

| Concentração teórica | Resultado - média (%)* | Desvio padrão | Desvio padrão relativo (%) | Amostra (n) |
|----------------------|------------------------|---------------|----------------------------|-------------|
| 50 ppb | 92,93 | 4,79 | 5,15 | 6 |
| 75 ppb | 109,06 | 3,54 | 3,25 | 6 |
| 110 ppb | 110,91 | 3,15 | 2,84 | 6 |

* cada valor corresponde a uma média aritmética de 6 determinações.

Tabela 3 – Precisão intra-dia (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 2º dia de experimento

| Concentração teórica | Resultado - média (%)* | Desvio padrão | Desvio padrão relativo (%) | Amostra (n) |
|----------------------|------------------------|---------------|----------------------------|-------------|
| 50 ppb | 95,71 | 8,56 | 8,95 | 6 |
| 75 ppb | 97,16 | 7,8 | 8,02 | 6 |
| 110 ppb | 103,12 | 8,79 | 8,53 | 6 |

* cada valor corresponde a uma média aritmética de 6 determinações.

A precisão entre-dias foi calculada a partir da média aritmética dos valores encontrados nestes dois dias ([tabela 4](#)).

Tabela 4 – Precisão entre-dias (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST): 2 dias de experimentos

| Concentração teórica | Resultado - média (%) | Desvio padrão | Desvio padrão relativo (%) | Amostra (n) |
|----------------------|-----------------------|---------------|----------------------------|-------------|
| 50 ppb | 94,3 | 2 | 2,1 | 12 |
| 75 ppb | 103,1 | 8,4 | 8,2 | 12 |
| 110 ppb | 107 | 5,5 | 5,1 | 12 |

O resultado da precisão da repetibilidade de injeções, expresso em DPR, foi de 0,65 % (para um total de 10 observações).

4.1.4 Exatidão

A [tabela 5](#) ilustra as medidas da exatidão do método, em relação às três diferentes faixas de concentração:

Tabela 5 – Exatidão (Espectroscopia por absorção atômica para quantificação de ferro – padrão NIST)

| Concentração teórica | Resultado – variação do % | Amostra (n) |
|----------------------|---------------------------|-------------|
| 50 ppb | 85,7 - 107 | 12 |
| 75 ppb | 87,5 - 113,8 | 12 |
| 110 ppb | 91,1 - 114,4 | 12 |

O quadro 3 apresenta um sumário dos resultados da validação:

Quadro 3 – Resultados da validação da quantificação de ferro hepático através da espectroscopia por absorção atômica

| DADOS DE VALIDAÇÃO | | | |
|---|---------------|----------------|----------------|
| LINEARIDADE (média de 9 curvas de calibração) | 0,9948 | | |
| LIMITE DE DETECÇÃO (3 vezes o ruído de base) | 2 ppb | | |
| LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (10 vezes o ruído de base) | 6 ppb | | |
| FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DA CURVA | 20 - 120 ppb | | |
| PRECISÃO (em DPR) | 50 ppb | 75 ppb | 110 ppb |
| INTRA-DIA* (três curvas + três controles (1 de cada concentração)) | 5,2 | 3,3 | 2,8 |
| ENTRE-DIAS (dois dias diferentes) | 2,1 | 8,2 | 5,1 |
| REPETIBILIDADE DE INJEÇÕES | 0,65% | | |
| EXATIDÃO | 85,7-107,0 % | 87,5 - 113,8 % | 91,1 - 114,4 % |

* resultados referentes a um dos dias de experimentos (precisão intra-dia).

4.1.5 Quantificação de ferro em tecido hepático bovino

Foram realizadas 30 biópsias consecutivas em fígado bovino, com agulha tru-cut (vide ANEXOS). Os fragmentos de tecido foram submetidos ao processo de liofilização, e posteriormente encaminhados para a determinação da concentração de ferro hepático através de espectroscopia por absorção atômica.

Dos 30 fragmentos obtidos, um foi excluído por apresentar teor de ferro acima de dois desvios-padrão em relação à média, conforme critérios de exclusão previamente determinados. Foram analisados, então, 29 fragmentos. O peso absoluto destes fragmentos variou de 2,89 a 5,39 mg, com média de 4,33 mg e desvio padrão de 0,54 mg. A média da CFH foi de 48,84 $\mu\text{g/g}$ (desvio padrão foi de 4,21; DPR de 8,98), variando de 37,78 a 55,04. A distribuição dos dados apresenta um padrão compatível com uma curva normal. Foi calculado o intervalo de confiança de 95%, que se situa entre 45,31 e 48,37 $\mu\text{g/g}$.

A tabela 6 ilustra os pesos das amostras e os respectivos valores das medidas da CFH.

Tabela 6 – Características de 29 amostras consecutivas de fígado bovino: peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH – em ppm ou $\mu\text{g/g}$).

| Amostra | peso (mg) | CFH(ppm*) |
|----------------|--------------|--------------|
| 1 | 3,88 | 37,58 |
| 2 | 2,89 | 43,32 |
| 3 | 3,45 | 45,39 |
| 4 | 4,04 | 44,48 |
| 5 | 3,74 | 44,17 |
| 6 | 5,39 | 41,30 |
| 7 | 4,23 | 49,60 |
| 8 | 4,52 | 49,89 |
| 9 | 4,36 | 53,37 |
| 10 | 4,25 | 55,04 |
| 11 | 4,92 | 43,96 |
| 13 | 4,18 | 53,73 |
| 14 | 4,77 | 44,42 |
| 15 | 4,81 | 43,04 |
| 16 | 4,41 | 45,01 |
| 17 | 4,34 | 49,12 |
| 18 | 3,77 | 52,49 |
| 19 | 5,09 | 48,23 |
| 20 | 4,5 | 52,64 |
| 21 | 4,33 | 49,59 |
| 22 | 4,17 | 50,53 |
| 23 | 4,81 | 41,83 |
| 24 | 4,99 | 42,53 |
| 25 | 4,02 | 45,80 |
| 26 | 3,79 | 45,30 |
| 27 | 3,73 | 46,73 |
| 28 | 4,68 | 46,97 |
| 29 | 4,99 | 44,89 |
| 30 | 4,39 | 47,52 |
| Média | 4,33 | 46,84 |
| DesvPad | 0,54 | 4,21 |
| DPR (%) | 12,50 | 8,98 |

* $\mu\text{g/g}$ de tecido seco

A figura 6 ilustra, através de um gráfico tipo “box plot”, a distribuição dos valores da concentração de ferro hepático (CFH) de amostras de fígado bovino.

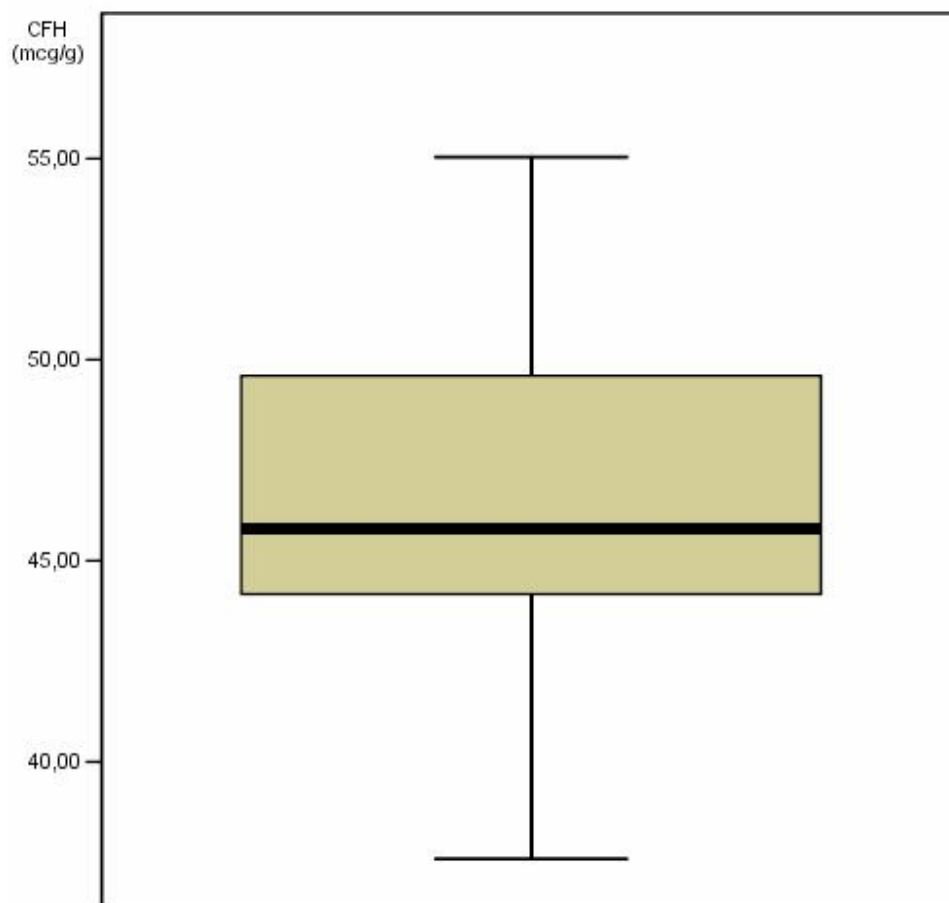


Figura 6: Concentração de ferro hepático (CFH) em amostras de fígado bovino.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO FRESCO E TECIDO SUBMETIDO À CONSERVAÇÃO EM PARAFINA

4.2.1 Peso absoluto dos fragmentos

Após a realização das biópsias “em cunha”, os fragmentos de tecido hepático foram pesados. Posteriormente, cada fragmento foi dividido em dois, que foram submetidos a processos distintos antes da quantificação de ferro: um grupo de fragmentos foi armazenado a uma temperatura de 80°C negativos, e

encaminhado para a liofilização; o outro foi submetido ao processo de conservação em parafina e, posteriormente, à desparafinação, para então ser encaminhado à liofilização. O peso médio dos fragmentos foi de 39,25 mg (mínimo 21,2 mg; máximo 71,6; desvio padrão 12,28) no grupo A (tecido fresco) e de 38,87 mg (mínimo 16 mg; máximo 78,5 mg; desvio padrão 15,15 mg) no grupo B (tecido submetido à conservação em parafina).

4.2.2 Análise comparativa da quantificação de ferro entre dois grupos: tecido fresco e tecido submetido à conservação em parafina

Os resultados das CFH e as respectivas massas das amostras estão ilustrados nas tabelas 7 e 8. Foram excluídas da análise 5 pares de fragmentos, um dos quais teve um fragmento perdido, enquanto os outros 4 pares apresentavam algum valor de CFH fora da faixa compreendida entre a média e mais ou menos dois desvios-padrão. Dos 25 pares de amostras analisados, observou-se que a média da CFH no grupo de tecido hepático fresco liofilizado foi de 177,27 ppm e o desvio padrão 18,87. No grupo de tecido submetido à conservação em parafina, a média foi de 167,69 e o desvio padrão 47,06.

Tabela 7: Peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH - em µg/g) das amostras de tecido hepático bovino fresco liofilizado (grupo A).

| TECIDO HEPÁTICO FRESCO | | |
|------------------------|--------------|---------------|
| Amostra | Peso (mg) | CFH (ppm)* |
| 2 | 41,1 | 176,23 |
| 3 | 47,4 | 206,88 |
| 4 | 40,4 | 191,19 |
| 5 | 48,1 | 214,14 |
| 6 | 71,6 | 173,60 |
| 7 | 51,6 | 185,68 |
| 8 | 59,6 | 124,68 |
| 10 | 60,7 | 211,20 |
| 13 | 50,7 | 169,98 |
| 14 | 28,1 | 154,34 |
| 15 | 33,2 | 162,13 |
| 16 | 38,2 | 159,77 |
| 17 | 21,2 | 192,40 |
| 18 | 35,6 | 165,47 |
| 19 | 35,2 | 167,98 |
| 20 | 27,9 | 185,81 |
| 21 | 35,7 | 191,95 |
| 22 | 22,8 | 173,55 |
| 23 | 27,1 | 179,32 |
| 24 | 32,7 | 167,85 |
| 25 | 36,4 | 167,11 |
| 26 | 28,1 | 178,94 |
| 27 | 33,5 | 176,38 |
| 28 | 34,8 | 172,89 |
| 29 | 31,8 | 182,37 |
| Média | 39,25 | 177,27 |
| DesvPad | 12,28 | 18,87 |
| DPR (%) | 31,29 | 10,65 |

* µg/g de tecido seco

Tabela 8: Peso (em mg) e concentração de ferro hepático (CFH em µg/g) das amostras de tecido hepático bovino submetido à conservação em parafina (grupo B).

| TECIDO CONSERVADO EM PARAFINA | | |
|-------------------------------|--------------|---------------|
| Amostra | Peso (mg) | CFH (ppm)* |
| 2 | 37,8 | 141,4 |
| 3 | 28,8 | 224,63 |
| 4 | 26,8 | 213,41 |
| 5 | 29,6 | 179,85 |
| 6 | 25,3 | 228,73 |
| 7 | 24,6 | 253,58 |
| 8 | 29,1 | 157,72 |
| 10 | 16 | 229,39 |
| 13 | 30,6 | 182,36 |
| 14 | 30,6 | 181,88 |
| 15 | 31,7 | 183,89 |
| 16 | 37,7 | 145,2 |
| 17 | 35,1 | 178,63 |
| 18 | 34,3 | 165,46 |
| 19 | 36,7 | 198,16 |
| 20 | 42,9 | 132,91 |
| 21 | 47,1 | 187,07 |
| 22 | 58,7 | 99,05 |
| 23 | 47,1 | 109,36 |
| 24 | 45,6 | 160,22 |
| 25 | 48 | 149,38 |
| 26 | 78,5 | 96,13 |
| 27 | 75,1 | 89,07 |
| 28 | 49,4 | 126,76 |
| 29 | 45,9 | 178,02 |
| Média | 38,87 | 167,69 |
| DesvPad | 15,15 | 47,06 |
| DPR (%) | 38,98 | 26,28 |

* µg/g de tecido seco

Para avaliar a diferença entre as médias da CFH no grupo de tecido hepático fresco e no grupo conservado em parafina, foi utilizado o Teste t de Student para amostras emparelhadas. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as medidas dos dois grupos ($t=1,317$; $p=0,2$).

A figura 7 ilustra, através de dois gráficos tipo “box plot”, a comparação das medidas da CFH entre os grupos.

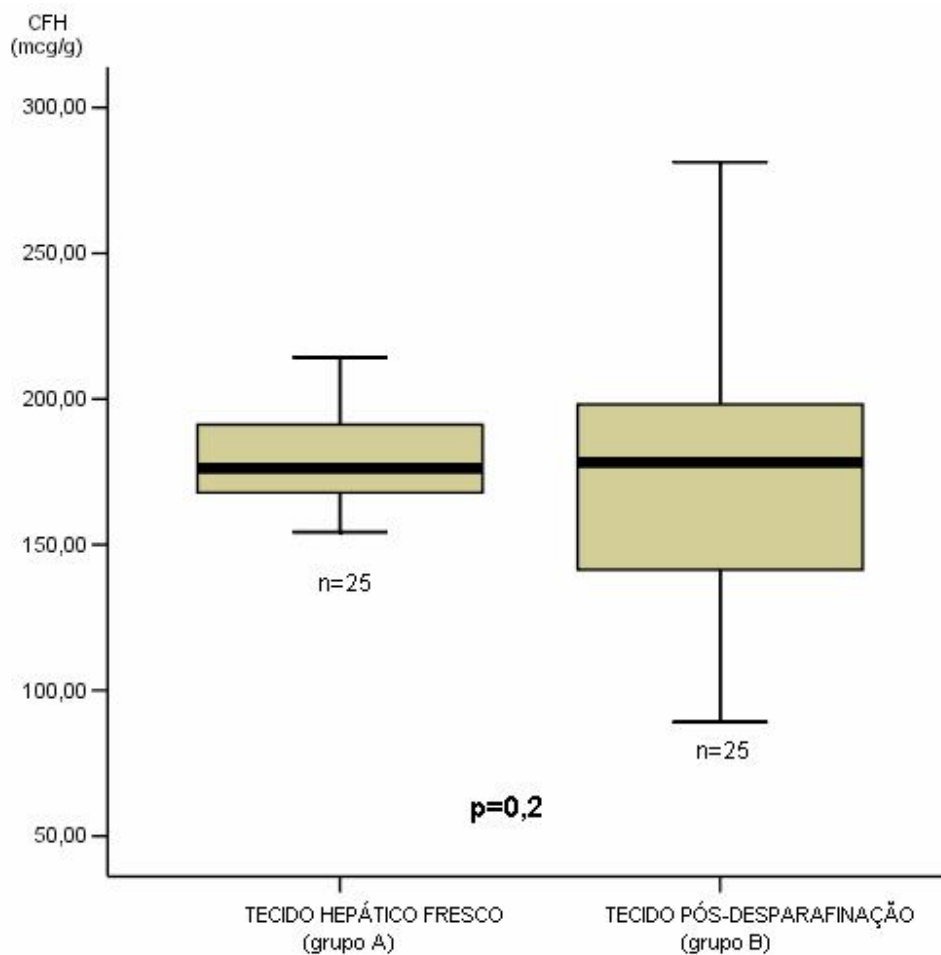


Figura 7 – Concentração de ferro hepático (CFH) em tecido hepático fresco e tecido submetido à conservação em parafina, conforme Teste t de Student para amostras emparelhadas.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo mostra o desenvolvimento e a validação de uma metodologia analítica para a quantificação de ferro no tecido hepático. Na seqüência do estudo, foi realizado um experimento para comparar a quantificação de ferro em tecido hepático fresco com tecido submetido à conservação em parafina.

A sobrecarga de ferro no tecido hepático vem sendo estudada há vários anos no Brasil, principalmente através da avaliação semi-quantitativa a partir dos achados histopatológicos ^{75,76}. Conforme extensa revisão da literatura, foram identificados, também, dois estudos que avaliaram a quantificação de ferro no tecido hepático ^{68,69}; em ambos, a sobrecarga de ferro foi pesquisada especificamente em pacientes com hepatite crônica pelo vírus C. Em relação à validação do método, Silva, em sua tese de Doutorado, contempla alguns elementos relacionados à validação da quantificação de ferro através da espectroscopia por absorção atômica utilizando, porém, uma preparação diferente da amostra ⁶⁸.

5.1 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Considerando que se trata de um método em fase de desenvolvimento no nosso meio, a realização de um estudo de validação era fundamental para garantir confiabilidade e reprodutibilidade necessárias para a sua utilização futura como um recurso diagnóstico na rotina assistencial e na pesquisa das hepatopatias

associadas à sobrecarga de ferro. O estudo seguiu um rigoroso padrão metodológico, observando as recomendações preconizados pelas diretrizes da I.C.H., F.D.A. e ANVISA ^{70,71,73,77}.

Do ponto de vista histórico, alguns autores demonstraram previamente a validação deste método, conforme publicado na literatura internacional ^{64,65,67}. Estes estudos datam de mais de uma década, enquanto as diretrizes de validação vigentes atualmente, elaboradas pela I.C.H. e o F.D.A., foram publicadas em 1996 e 2001, respectivamente ⁷⁰⁻⁷². Portanto, o caráter contemporâneo pode ser considerado uma importante característica do presente estudo, no qual o método foi validado com maior rigor, tendo avaliado mais parâmetros que os métodos descritos na literatura.

A espectroscopia por absorção atômica é, reconhecidamente, o método de escolha para a quantificação de ferro no tecido hepático ^{43,64,65}. Considerando a pequena quantidade de amostra disponível para a realização da quantificação, optou-se pela espectroscopia por absorção atômica acoplada a um sistema de vaporização da amostra através de um forno de grafite. Esta particularidade oferece uma maior sensibilidade ao método, comparativamente com a utilização do recurso da chama, conforme demonstrado previamente na literatura ^{64,65}, o que permite analisar uma amostra menor. Isto tem particular importância no caso de biópsias de fígado humano.

Os resultados observados com a realização das curvas-padrão indicam que o método apresentou uma excelente linearidade na faixa de concentração entre 20 e 120 partes por bilhão de ferro. Esta faixa compreende os valores considerados relevantes clinicamente na quantificação de ferro em tecido hepático. Deve ser

considerado, ainda, que amostras com maior ou menor concentração de ferro podem ser diluídas adequadamente para se adaptar a esta faixa de concentração.

A precisão do método foi avaliada de forma categorizada através da repetibilidade de injeções, da precisão intra-dia e da precisão entre-dias. Foram observados valores de desvio padrão relativo inferiores a 1% para a repetibilidade de injeções, e 10 % para a precisão intra-dia e a precisão entre-dias, o que permite considerar o método preciso ⁷⁰⁻⁷².

A avaliação da exatidão do método, através das medidas do teor de ferro nas amostras do padrão NIST, cujas concentrações de ferro eram previamente conhecidas, apresentou resultados satisfatórios, observando-se variações médias sempre inferiores ao limite de aceitação de 15% ⁷⁰⁻⁷².

Foram adotadas medidas para evitar potenciais fontes de contaminação. Todos os reagentes utilizados eram padronizados e apresentavam procedência reconhecidamente certificada. Os materiais utilizados no preparo das amostras foram submetidos a processos de lavagem, para evitar contaminações com potenciais elementos que pudessem interferir na leitura da concentração de ferro pelo espectrofotômetro. Além disso, o correto ajuste dos parâmetros de regulação do aparelho para a quantificação de ferro também confere especificidade ao método ⁷⁸.

Após a validação do método frente ao padrão NIST, foram realizados experimentos com fragmentos de tecido hepático bovino fresco, obtidos através de biópsias com agulha "tru-cut". Os fragmentos foram submetidos a um processo de liofilização para obtenção de tecido seco, para serem encaminhados, posteriormente, à quantificação de ferro através da espectroscopia por absorção

atômica. O procedimento realizado para a coleta de tecido através de biópsias teve a finalidade de simular uma situação análoga à da prática assistencial. Procurou-se obter os fragmentos de tecido hepático a partir de punções em sítios bem próximos entre si, com o objetivo de minimizar eventuais variações na concentração de ferro no parênquima hepático.

Os fragmentos de tecido hepático foram submetidos à liofilização antes de serem encaminhados para a quantificação de ferro pela EAS. A liofilização consiste em um processo extremamente eficaz na remoção da umidade de materiais ou tecidos. Chua-anusorn e colaboradores relataram a utilização deste processo na obtenção de tecido seco para a quantificação de ferro ³⁵. No entanto, na maioria dos estudos publicados, foram utilizados outros métodos, como estufas ou fornos ^{36,37,43,68}. Não há dados na literatura referentes à comparação entre estes métodos em estudos de quantificação de ferro em tecido hepático. Na realidade, parece que qualquer um dos métodos pode ser utilizado, desde que seja capaz de remover eficientemente a umidade do tecido.

Os valores referentes à concentração de ferro hepático nas amostras de fígado bovino apresentaram uma distribuição compatível com uma curva normal, corroborando os resultados encontrados na validação, referentes à exatidão e precisão do método. Além disso, foi demonstrada uma adequada homogeneidade do teor de ferro no tecido hepático.

A validação de um método para a quantificação de ferro no tecido hepático possui importantes implicações clínicas. Especificamente, a utilização da CHF e do IFH tem aplicação prática no diagnóstico diferencial da hemocromatose hereditária (HH) com os estados de sobrecarga secundária de ferro. Além disso, a

determinação da CFH permite avaliar, de forma objetiva e direta, o grau de sobrecarga de ferro, podendo apresentar correlação com o estágio clínico-histopatológico da doença ^{27,40,63,79}.

Apesar dos recentes avanços no campo da biologia molecular, relacionados à possibilidade de identificar a presença de mutações do gene da hemocromatose (HFE) em pacientes com suspeita de HH, existem situações em que as principais mutações descritas até o momento podem se apresentar negativas. A presença das mutações do gene HFE foi originalmente descrita em populações de regiões do norte da Europa, de origem étnica celta, nas quais as alterações genótípicas compatíveis com a presença das mutações denominadas C282Y e/ou H63D respondem pelas bases etiopatológicas da grande maioria dos pacientes com a doença ^{10,16,80-82}. Atualmente, sabe-se que, em outros contextos clínico-epidemiológicos, pode haver importante limitação dos testes genéticos comumente empregados no diagnóstico da HH ⁸³⁻⁸⁸. Nestas situações, a utilização de parâmetros bioquímicos relacionados à quantificação de ferro no tecido hepático, principalmente um IFH superior a 1,9, podem sugerir o diagnóstico de HH ^{10,16,19,33,36,42,43,49,51,89}. No entanto, conforme comentado anteriormente, outros autores observaram deposição acentuada de ferro no tecido hepático em fases de cirrose avançada, independentemente da causa, não permitindo a utilização destes parâmetros para o diagnóstico diferencial neste contexto clínico-patológico ^{33,42,45-}

47 .

5.2 COMPARAÇÃO DA QUANTIFICAÇÃO DE FERRO EM TECIDO HEPÁTICO FRESCO E EM TECIDO SUBMETIDO À CONSERVAÇÃO EM PARAFINA

A comparação da quantificação de ferro em tecido hepático fresco com tecido conservado em parafina foi feita utilizando-se fragmentos obtidos por biópsias “em cunha”, com bisturi. Através desta técnica, cada fragmento foi posteriormente dividido em duas metades, permitindo, assim, comparar duas unidades amostrais com características semelhantes, com exceção do tipo de processo ao qual foram submetidas. Dessa forma, procurou-se minimizar eventuais influências da variabilidade da CFH em diferentes locais do fígado sobre os resultados dos dois grupos, o que poderia representar um viés⁹⁰⁻⁹².

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a CFH no grupo de tecido hepático fresco e a observada no grupo constituído por fragmentos de tecido conservado em parafina. Observou-se um maior desvio-padrão na análise dos fragmentos desparafinados, o que pode ser atribuído a uma eventual heterogeneidade na eficiência do processo de remoção da parafina dos fragmentos, conforme sugerido previamente por van Deursen e colaboradores³⁴. A partir dos resultados observados, é possível afirmar que a quantificação de ferro em tecido hepático pode ser realizada tanto em fragmentos de tecido fresco, quanto em tecido conservado em parafina. Estes achados podem contribuir, futuramente, para a utilização deste método na avaliação de material armazenado em blocos de parafina, no nosso meio. Até o presente momento, não havia dados na literatura nacional que autorizassem a utilização de material conservado em parafina para a quantificação de ferro no tecido hepático.

Em relação à exclusão de cinco pares de fragmentos da análise, este procedimento foi adotado de acordo com os critérios de exclusão estabelecidos pelos autores. Observou-se uma CFH fora da faixa estabelecida (de dois desvios-padrão distante da média) em quatro pares de fragmentos excluídos, enquanto que um fragmento do outro par foi perdido, quando da realização do processo de liofilização. Considerando que o tamanho amostral consistia em 17 pares, a amostra analisada ainda possui tamanho suficiente para detectar eventuais diferenças entre os grupos, mesmo após a exclusão dos fragmentos. Além disso, foi realizada uma outra análise estatística, utilizando-se um critério de exclusão de 3 DP em relação à média da CFH (excluindo-se, assim, apenas um par de fragmentos, além do par que foi perdido); não foi constatada alteração significativa nos resultados do estudo (vide ANEXOS).

Para avaliar estatisticamente as diferenças entre a CFH nos dois grupos, foi utilizado o Teste t de Student para amostras emparelhadas, que permite comparar eficientemente pares de amostras semelhantes entre si^{93,94}. Este procedimento difere do adotado em alguns estudos semelhantes, que empregaram análises baseadas no coeficiente de correlação linear de Pearson.^{34,36,37} Tais estudos utilizaram fragmentos de tecido hepático humano de mais de um paciente, enquanto o presente estudo avaliou diversos fragmentos de um único fígado bovino, os quais deveriam apresentar, teoricamente, valores de CFH muito próximos uns dos outros. Dessa forma, concluiu-se que a utilização de um método de correlação, com base no desenvolvimento de uma reta de regressão, não seria adequada para análise dos resultados do presente estudo.

Observou-se uma discrepância entre os valores da CFH encontrados na 1ª fase do estudo (ilustrados na tabela 6) e a CFH dos fragmentos estudados na 2ª fase (tabelas 7 e 8). A média da CFH nos fragmentos obtidos com agulha “tru-cut” foi bastante inferior à observada nos experimentos seguintes, assim como em relação à média da CFH do padrão de referência utilizado ⁷⁴. A impressão dos autores é de que não há qualquer relação destes achados com o tipo de procedimento utilizado para a obtenção do tecido (tipo de biópsia) ou com o peso dos fragmentos, uma vez que todas as amostras são diluídas conforme procedimento padronizado, detalhado na seção “Método”. Uma possível interpretação para tais achados é que os fragmentos eram procedentes de fígados de animais diferentes, considerando que os limites de variação da CFH em fígado bovino não são conhecidos. Outra possibilidade aventada diz respeito a eventuais processos que a amostra possa ter sido submetida antes da sua aquisição, pelo pesquisador, no estabelecimento comercial. É importante salientar, entretanto, que o padrão NIST foi utilizado como controle durante a análise de todos os fragmentos. Além disso, a avaliação dos resultados da quantificação de ferro hepático em cada fase do estudo, separadamente, indica que o método é confiável e reproduzível para os objetivos propostos.

A quantificação de ferro em amostras conservadas em blocos de parafina é importante, principalmente, por dois fatores ^{35,37,43}. Em primeiro lugar, pacientes com hepatopatia crônica associada a estados de sobrecarga de ferro investigados previamente sem a quantificação de ferro no tecido hepático, poderiam beneficiar-se deste método em caráter adicional à investigação pregressa, sem a necessidade da realização de uma nova biópsia. O outro fator diz respeito à

possibilidade da realização da quantificação de ferro no mesmo fragmento obtido por biópsia, e encaminhado para análise histopatológica, conforme proposto por Ludwig e colaboradores ⁴³. Desta forma, o presente estudo oferece uma técnica alternativa à quantificação de ferro em amostras de tecido fresco, devidamente validada, e com perspectivas concretas de ser utilizada como um recurso diagnóstico adicional na prática clínica em nosso meio.

Em resumo, a espectroscopia por absorção atômica encontra-se validada para a quantificação de ferro no tecido hepático, e é possível realizar este método utilizando tanto tecido hepático fresco, quanto tecido submetido à conservação em parafina.

6. CONCLUSÕES

6.1 Considerando os parâmetros analíticos linearidade, precisão, exatidão e especificidade, pode-se concluir que o método da espectroscopia por absorção atômica encontra-se validado pelo presente estudo, e portanto, adequado para a quantificação de ferro no tecido hepático.

6.2 O presente estudo mostrou que é possível realizar a quantificação de ferro através da espectroscopia por absorção atômica em tecido hepático bovino liofilizado, obtido através de biópsias com agulha “tru-cut” e biópsias “em cunha”.

6.3 A comparação da quantificação de ferro em tecido hepático fresco e tecido conservado em parafina permite concluir que o método pode ser utilizado de forma confiável e reproduzível para a quantificação de ferro hepático em amostras estocadas em bloco de parafina.

Referências bibliográficas:

1. Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med* 1999; **341**(26):1986-1995.
2. Andrews NC. Iron homeostasis: insights from genetics and animal models. *Nat Rev Genet* 2000; **1**(3):208-217.
3. Bacon B, Brown KE. Iron Metabolism and Disorders of Iron Overload. In: Kaplowitz N, editor. *Liver and Biliary Diseases*. 2nd ed. Baltimore, Maryland: Williams&Wilkins; 1996: 349-362.
4. Bacon B, Tavill AS. Iron Overload States. In: Zakim D, Boyer T, editors. *Hepatology: a Textbook of Liver Diseases*. 3rd ed. Philadelphia, PA. USA.: W.B. Saunders Company; 1997: 405-413.
5. Philpott CC. Molecular aspects of iron absorption: Insights into the role of HFE in hemochromatosis. *Hepatology* 2002; **35**(5):993-1001.
6. Pietrangelo A. Iron, friend or foe? "Freedom" makes the difference. *J Hepatol* 2000; **32**(5):862-864.
7. Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynyk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut* 2002; **51**(2):290-295.
8. Pietrangelo A. Haemochromatosis. *Gut* 2003; **52 Suppl 2**:ii23-ii30.
9. Pietrangelo A. Mechanisms of Liver Injury and Fibrosis Due to Iron and Copper. 53-58. 2003. Liver Disease in the 21st Century: AASLD Post Graduate Course. Boston, 2003.
Ref Type: Conference Proceeding
10. Bacon BR, Powell LW, Adams PC, Kresina TF, Hoofnagle JH. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. *Gastroenterology* 1999; **116**(1):193-207.
11. Greenson JK. Pathology of Metal-Induced Liver Disease. 49-52. 2003. Liver Disease in the 21st Century: AASLD Meeting Post Graduate course. Boston, 2003.
Ref Type: Conference Proceeding
12. Iannou GN, Kowdley KV. Iron, HFE Mutations, and Hepatocellular Carcinoma: Is Hepatic Iron a Carcinogen? *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 2003; **1**(4):246-248.

13. Belló-Klein A. Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres. In: Marroni NP, editor. *Estresse Oxidativo e Antioxidantes*. Canoas,RS. Brasil: Editora da Ulbra; 2002: 15-19.
14. Farinati F, Cardin R, De Maria N, Della LG, Marafin C, Lecis E et al. Iron storage, lipid peroxidation and glutathione turnover in chronic anti-HCV positive hepatitis. *J Hepatol* 1995; **22**(4):449-456.
15. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
16. Adams P, Brissot P, Powell LW. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *J Hepatol* 2000; **33**(3):485-504.
17. Harrison SA, Bacon BR. Hereditary hemochromatosis: update for 2003. *J Hepatol* 2003; **38 Suppl 1**:S14-S23.
18. Powell LW. Hereditary hemochromatosis and iron overload diseases. *J Gastroenterol Hepatol* 2002; **17 Suppl**:S191-S195.
19. Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis. *Hepatology* 2001; **33**(5):1321-1328.
20. Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Cassanelli S et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; **341**(10):725-732.
21. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
22. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
23. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
24. Brissot P, Troadec MB, Loreal O. Intestinal absorption of iron in HFE-1 hemochromatosis: local or systemic process? *J Hepatol* 2004; **40**(4):702-709.
25. Niederau C, Fischer R, Purschel A, Stremmel W, Haussinger D, Strohmeyer G. Long-term survival in patients with hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 1996; **110**(4):1107-1119.
26. Diwakaran HH, Befeler AS, Britton RS, Brunt EM, Bacon BR. Accelerated hepatic fibrosis in patients with combined hereditary hemochromatosis and chronic hepatitis C infection. *J Hepatol* 2002; **36**(5):687-691.

27. Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DH. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 2002; **122**(2):281-289.
28. di Bisceglie AM, Axiotis CA, Hoofnagle JH, Bacon BR. Measurements of iron status in patients with chronic hepatitis. *Gastroenterology* 1992; **102**(6):2108-2113.
29. Giannini E, Mastracci L, Botta F, Romagnoli P, Fasoli A, Risso D et al. Liver iron accumulation in chronic hepatitis C patients without HFE mutations: relationships with histological damage, viral load and genotype and alpha-glutathione S-transferase levels. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; **13**(11):1355-1361.
30. Fontana RJ, Israel J, LeClair P, Banner BF, Tortorelli K, Grace N et al. Iron reduction before and during interferon therapy of chronic hepatitis C: results of a multicenter, randomized, controlled trial. *Hepatology* 2000; **31**(3):730-736.
31. Bonkovsky HL. Iron as a comorbid factor in chronic viral hepatitis. *Am J Gastroenterol* 2002; **97**(1):1-4.
32. Walker RJ, Miller JP, Dymock IW, Shilkin KB, Williams R. Relationship of hepatic iron concentration to histochemical grading and to total chelatable body iron in conditions associated with iron overload. *Gut* 1971; **12**(12):1011-1014.
33. Ludwig J, Hashimoto E, Porayko MK, Moyer TP, Baldus WP. Hemosiderosis in cirrhosis: a study of 447 native livers. *Gastroenterology* 1997; **112**(3):882-888.
34. Van deursen C, de Metz M, Koudstaal J, Brombacher P. Measurement of liver iron content in paraffin-embedded biopsies. *J Clin Chem Clin Biochem* 1988; **26**(11):689-691.
35. Chua-anusorn W, Webb J, Macey DJ, Pootrakul P, St Pierre TG. The effect of histological processing on the form of iron in iron-loaded human tissues. *Biochim Biophys Acta* 1997; **1360**(3):255-261.
36. Olynyk JK, O'Neill R, Britton RS, Bacon BR. Determination of hepatic iron concentration in fresh and paraffin-embedded tissue: diagnostic implications. *Gastroenterology* 1994; **106**(3):674-677.
37. Beilby JP, Prins AW, Swanson NR. Determination of hepatic iron concentration in fresh and paraffin-embedded tissue. *Clin Chem* 1999; **45**(4):573-574.

38. Adams PC. Hepatic iron in hemochromatosis. *Dig Dis Sci* 1990; **35**(6):690-692.
39. Adams PC, Bradley C, Henderson AR. Evaluation of the hepatic iron index as a diagnostic criterion for genetic hemochromatosis. *J Lab Clin Med* 1997; **130**(5):509-514.
40. Bassett ML, Halliday JW, Powell LW. Value of hepatic iron measurements in early hemochromatosis and determination of the critical iron level associated with fibrosis. *Hepatology* 1986; **6**(1):24-29.
41. Deugnier YM, Turlin B, Powell LW, Summers KM, Moirand R, Fletcher L et al. Differentiation between heterozygotes and homozygotes in genetic hemochromatosis by means of a histological hepatic iron index: a study of 192 cases. *Hepatology* 1993; **17**(1):30-34.
42. Kowdley KV, Trainer TD, Saltzman JR, Pedrosa M, Krawitt EL, Knox TA et al. Utility of hepatic iron index in American patients with hereditary hemochromatosis: a multicenter study. *Gastroenterology* 1997; **113**(4):1270-1277.
43. Ludwig J, Batts KP, Moyer TP, Baldus WP, Fairbanks VF. Liver biopsy diagnosis of homozygous hemochromatosis: a diagnostic algorithm. *Mayo Clin Proc* 1993; **68**(3):263-267.
44. Sallie RW, Reed WD, Shilkin KB. Confirmation of the efficacy of hepatic tissue iron index in differentiating genetic haemochromatosis from alcoholic liver disease complicated by alcoholic haemosiderosis. *Gut* 1991; **32**(2):207-210.
45. Cotler SJ, Bronner MP, Press RD, Carlson TH, Perkins JD, Emond MJ et al. End-stage liver disease without hemochromatosis associated with elevated hepatic iron index. *J Hepatol* 1998; **29**(2):257-262.
46. Deugnier Y, Turlin B, le Quilleuc D, Moirand R, Loreal O, Messner M et al. A reappraisal of hepatic siderosis in patients with end-stage cirrhosis: practical implications for the diagnosis of hemochromatosis. *Am J Surg Pathol* 1997; **21**(6):669-675.
47. Press RD, Flora K, Gross C, Rabkin JM, Corless CL. Hepatic iron overload: direct HFE (HLA-H) mutation analysis vs quantitative iron assays for the diagnosis of hereditary hemochromatosis. *Am J Clin Pathol* 1998; **109**(5):577-584.
48. Barry M. Liver iron concentration, stainable iron, and total body storage iron. *Gut* 1974; **15**:411-415.

49. Deugnier YM, Loreal O, Turlin B, Guyader D, Jouanolle H, Moirand R et al. Liver pathology in genetic hemochromatosis: a review of 135 homozygous cases and their bioclinical correlations. *Gastroenterology* 1992; **102**(6):2050-2059.
50. Nash S, Marconi S, Sikorska K, Naeem R, Nash G. Role of liver biopsy in the diagnosis of hepatic iron overload in the era of genetic testing. *Am J Clin Pathol* 2002; **118**(1):73-81.
51. Turlin B, Deugnier Y. Evaluation and interpretation of iron in the liver. *Semin Diagn Pathol* 1998; **15**(4):237-245.
52. Imbert-Bismut F, Charlotte F, Turlin B, Khalil L, Piton A, Brissot P et al. Low hepatic iron concentration: evaluation of two complementary methods, colorimetric assay and iron histological scoring. *J Clin Pathol* 1999; **52**(6):430-434.
53. Deugnier Y, Margules S, Brissot P, Deugnier MA, Bisconte JC, Bourel M et al. Comparative study between biochemical and histological methods and image analysis in liver iron overload. *J Clin Pathol* 1982; **35**(1):45-51.
54. George PM, Conaghan C, Angus HB, Walmsley TA, Chapman BA. Comparison of histological and biochemical hepatic iron indexes in the diagnosis of genetic haemochromatosis. *J Clin Pathol* 1996; **49**(2):159-163.
55. Lyon E, Frank EL. Hereditary hemochromatosis since discovery of the HFE gene. *Clin Chem* 2001; **47**(7):1147-1156.
56. Stuart KA, Fletcher LM, Clouston AD, Lynch SV, Purdie DM, Kerlin P et al. Increased hepatic iron and cirrhosis: no evidence for an adverse effect on patient outcome following liver transplantation. *Hepatology* 2000; **32**(6):1200-1207.
57. Bradlow BA, Dunn JA, Higginson J. The effect of cirrhosis on iron storage. *American Journal of Pathology* 1961; **39**:221-234.
58. Sabesin SM, Thomas LB. Parenchymal siderosis In patients with preexisting portal cirrhosis. A pathologic entity simulating idiopathic and transfusional hemochromatosis. *Gastroenterology* 1964; **46**:477-485.
59. Bonkovsky HL, Slaker DP, Bills EB, Wolf DC. Usefulness and limitations of laboratory and hepatic imaging studies in iron-storage disease. *Gastroenterology* 1990; **99**(4):1079-1091.
60. Bonkovsky HL, Rubin RB, Cable EE, Davidoff A, Rijcken TH, Stark DD. Hepatic iron concentration: noninvasive estimation by means of MR imaging techniques. *Radiology* 1999; **212**(1):227-234.

61. Brittenham GM, Badman DG. Noninvasive measurement of iron: report of an NIDDK workshop. *Blood* 2003; **101**(1):15-19.
62. Roberts EA, Schilsky ML. A practice guideline on Wilson disease. *Hepatology* 2003; **37**(6):1475-1492.
63. Barry M, Sherlock S. Measurement of liver-iron concentration in needle-biopsy specimens. *Lancet* 1971; **1**(7690):100-103.
64. Kreeftenberg HG, Koopman BJ, Huizenga JR, van Vilsteren T, Wolthers BG, Gips CH. Measurement of iron in liver biopsies--a comparison of three analytical methods. *Clin Chim Acta* 1984; **144**(2-3):255-262.
65. Chakrabarti CL, Wan CC, Li WC. Direct determination of traces of copper, zinc, lead, cobalt, iron and cadmium in bovine liver by graphite furnace atomic absorption spectrometry using the solid sampling and the platform techniques. *Spectrochimica Acta* 1980; **35B**:93-105.
66. Perkin-Elmer. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. 3rd[0303-0152]. 1994. United States of America, The Perkin-Elmer Corporation.
Ref Type: Catalog
67. Van Beek H, Greefkes HCA, Baars AJ. Determination of copper, iron, manganese, lead and cadmium in automatically wet-digested animal tissue by graphite-furnace atomic-absorption spectrometry with Zeeman background correction. *Talanta* 1987; **34**(6):580-582.
68. Silva IS. Quantificação de ferro em pacientes portadores de hepatite crônica pelo vírus C Escola Paulista de Medicina; 2002.
69. Aranda R, Martinelli AI, Carneiro AA, Elias JR, Ramalho IN, Zucoloto S et al. Quantificação de ferro no fígado de pacientes com hepatite C crônica. *Gastroenterologia Y Hepatologia* 2004; **27**(Supl. 2):22.
70. Guideline for Industry. Text on Validation of Analytical Procedures: ICH-Q2A. 1995. International Conference on Harmonization.
Ref Type: Conference Proceeding
71. Guidance for Industry. Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. 1996. International Conference on Harmonization.
Ref Type: Conference Proceeding
72. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001.
Ref Type: Report

73. Agência Nacional de Vigilância Epidemiológica. Resolução número 899 de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União - Brasil . 2003. 2-6-2003.
Ref Type: Newspaper
74. National Institute of Standards & Technology. Certificate of Analysis: standard reference material 1577b bovine liver. 1991. Gaithersburg,MD.
Ref Type: Catalog
75. Barros JP, Mincis M, Lanzoni VP, Andriolo M, Novo NF, Juliano Y. Iron, copper and alpha 1-antitrypsin deficiency in the liver of cirrhotic and schistosomotic patients. *Arq Gastroenterol* 1992; **29**(3):86-94.
76. Wortmann AC, Cerski CT, Álvares-da-Silva MR, Brandão A, da Silveira TR. Hemossiderose em cirrose: um estudo preliminar em fígados explantados. *GED* 2003; **22**(suppl.3):S25.
77. U.S.Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation. 2001.
Ref Type: Report
78. The Perkin-Elmer Corporation. Analytical Methods for Atomic Absorption Spectroscopy. 1996. United States of America.
Ref Type: Catalog
79. Adams PC. Is there a threshold of hepatic iron concentration that leads to cirrhosis in C282Y hemochromatosis? *Am J Gastroenterol* 2001; **96**(2):567-569.
80. Adams PC, Chakrabarti S. Genotypic/phenotypic correlations in genetic hemochromatosis: evolution of diagnostic criteria. *Gastroenterology* 1998; **114**(2):319-323.
81. Rosmorduc O, Poupon R, Nion I, Wendum D, Feder J, Berezziat G et al. Differential HFE allele expression in hemochromatosis heterozygotes. *Gastroenterology* 2000; **119**(4):1075-1086.
82. Olynyk JK, Cullen DJ, Aquilia S, Rossi E, Summerville L, Powell LW. A population-based study of the clinical expression of the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; **341**(10):718-724.
83. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
84. Pietrangelo A, Montosi G, Totaro A, Garuti C, Conte D, Cassanelli S et al. Hereditary hemochromatosis in adults without pathogenic mutations in the hemochromatosis gene. *N Engl J Med* 1999; **341**(10):725-732.

85. Piperno A, Sampietro M, Pietrangelo A, Arosio C, Lupica L, Montosi G et al. Heterogeneity of hemochromatosis in Italy. *Gastroenterology* 1998; **114**(5):996-1002.
86. Bittencourt PL, Palacios SA, Couto CA, Cancado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA et al. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. *Braz J Med Biol Res* 2002; **35**(3):329-335.
87. Camaschella C, Fargion S, Sampietro M, Roetto A, Bosio S, Garozzo G et al. Inherited HFE-unrelated hemochromatosis in Italian families. *Hepatology* 1999; **29**(5):1563-1564.
88. Pietrangelo A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. *N Engl J Med* 2004; **350**(23):2383-2397.
89. Guyader D, Jacquelinet C, Moirand R, Turlin B, Mendler MH, Chaperon J et al. Noninvasive prediction of fibrosis in C282Y homozygous hemochromatosis. *Gastroenterology* 1998; **115**(4):929-936.
90. Emond MJ, Bronner MP, Carlson TH, Lin M, Labbe RF, Kowdley KV. Quantitative study of the variability of hepatic iron concentrations. *Clin Chem* 1999; **45**(3):340-346.
91. Overmoyer BA, McLaren CE, Brittenham GM. Uniformity of liver density and nonheme (storage) iron distribution. *Arch Pathol Lab Med* 1987; **111**(6):549-554.
92. Villeneuve JP, Bilodeau M, Lepage R, Cote J, Lefebvre M. Variability in hepatic iron concentration measurement from needle-biopsy specimens. *J Hepatol* 1996; **25**(2):172-177.
93. Callegari-Jacques SM. Comparação entre as médias de duas amostras pareadas. *Bioestatística: princípios e aplicações*. 1a edição ed. Porto Alegre: Artmed; 2003: 78-83.
94. Motta VT, Wagner MB. Análise de duas médias. In: Motta VT, Wagner MB, editors. *Bioestatística*. 1a Ed. ed. Caxias do Sul: EDUCS (Editora da Universidade de Caxias do Sul); 2003: 85-107.

ANEXOS

ANEXO 1 – Dados brutos dos experimentos de validação (1º dia):

Dia 1

Curva padrão

| | massa (mg) | | | Conc. | Área | |
|-----------|------------|--|---------------|-------|-------|-------|
| Amostra A | 3,79 | | | 20 | 0,055 | |
| Am. B | 3,96 | | | 40 | 0,141 | |
| Am. C | 3,83 | | | 60 | 0,292 | |
| Am. D | 4,47 | | Branco | 80 | 0,422 | |
| Am. E | 4,05 | | 21 | 100 | | 0,441 |
| Am. F | 3,85 | | | 120 | 0,683 | |

| CQ1 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|-------|------------|-------------|------|
| c1a | 51,60 | 70,97 | 49,97 | 96,83 | 92,93 | 4,79 | 5,15 |
| c1b | 53,92 | 72,23 | 51,23 | 95,01 | | | |
| c1c | 52,15 | 69,17 | 48,17 | 92,37 | máx | mín. | |
| c1d | 60,86 | 80,86 | 59,86 | 98,35 | 98,35 | 85,72 | |
| c1e | 55,14 | 68,27 | 47,27 | 85,72 | | | |
| c1f | 52,42 | 67,80 | 46,80 | 89,28 | | | |

| CQ2 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|--------|------------|-------------|------|
| c2a | 69,74 | 97,15 | 76,15 | 109,20 | 109,06 | 3,54 | 3,25 |
| c2b | 72,86 | 96,48 | 75,48 | 103,59 | | | |
| c2c | 70,47 | 98,36 | 77,36 | 109,77 | máx | mín. | |
| c2d | 82,25 | 108,80 | 87,80 | 106,75 | 113,78 | 103,59 | |
| c2e | 74,52 | 103,90 | 82,90 | 111,25 | | | |
| c2f | 70,84 | 101,60 | 80,60 | 113,78 | | | |

| CQ3 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|--------|------------|-------------|------|
| c3a | 104,60 | 140,70 | 119,70 | 114,43 | 110,91 | 3,15 | 2,84 |
| c3b | 109,30 | 140,80 | 119,80 | 109,61 | | | |
| c3c | 105,71 | 136,90 | 115,90 | 109,64 | máx | mín. | |
| c3d | 123,37 | 176,00 | - | - | 114,43 | 107,00 | |
| c3e | 111,78 | 140,60 | 119,60 | 107,00 | | | |
| c3f | 106,26 | 142,00 | 121,00 | 113,87 | | | |

Observação: utilizadas 6 amostras com concentrações crescentes, a partir do padrão NIST. Realizadas curvas de calibração em 3 faixas de concentração (CQ 1, 2 e 3), representando concentrações baixa, média e alta, respectivamente.

ANEXO 2 – Dados brutos dos experimentos de validação (2º dia):

Dia 2

Curva padrão

| | massa (mg) | | | Conc. | Área | |
|-------|------------|--|---------------|-------|-------|-------|
| Am. A | 3,5 | | | 20 | 0,052 | |
| Am. B | 3,26 | | | 40 | 0,099 | |
| Am. C | 2,72 | | | 60 | 0,151 | |
| Am. D | 3,87 | | Branco | 80 | 0,204 | |
| Am. E | 3,63 | | 5,84 | 100 | 0,237 | 0,441 |
| Am. F | 3,54 | | | 120 | 0,281 | |

| CQ1 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|--------|------------|-------------|------|
| c1a | 47,66 | 51,63 | 45,79 | 96,08 | 95,71 | 8,56 | 8,95 |
| c1b | 44,39 | 45,18 | 39,34 | 88,63 | | | |
| c1c | 37,04 | 37,75 | 31,91 | 86,16 | máx | mín. | |
| c1d | 52,69 | 88,38 | - | - | 106,97 | 86,16 | |
| c1e | 49,43 | 58,71 | 52,87 | 106,97 | | | |
| c1f | 48,20 | 54,38 | 48,54 | 100,70 | | | |

| CQ2 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|--------|------------|-------------|------|
| c2a | 64,40 | 62,17 | 56,33 | 87,47 | 97,16 | 7,80 | 8,02 |
| c2b | 59,98 | 63,00 | 57,16 | 95,29 | | | |
| c2c | 50,05 | 57,86 | 52,02 | 103,94 | máx | mín. | |
| c2d | 71,21 | 72,00 | 66,16 | 92,91 | 106,20 | 87,47 | |
| c2e | 66,79 | 76,77 | 70,93 | 106,20 | | | |
| c2f | 65,14 | 59,74 | 53,90 | - | | | |

| CQ3 | teórico | prático | prático - branco | % | média | DP | DPR |
|-----|---------|---------|------------------|--------|------------|-------------|------|
| c3a | 96,60 | 97,73 | 91,89 | 95,12 | 103,12 | 8,79 | 8,53 |
| c3b | 89,98 | 103,00 | 97,16 | 107,98 | | | |
| c3c | 75,07 | 90,67 | 84,83 | 113,00 | máx | mín. | |
| c3d | 106,81 | 103,10 | 97,26 | 91,06 | 113,00 | 91,06 | |
| c3e | 100,19 | 116,40 | 110,56 | 110,35 | | | |
| c3f | 97,70 | 104,70 | 98,86 | 101,18 | | | |

Observação: idem aos experimentos do 1º dia (página anterior).

ANEXO 3 – Dados brutos dos experimentos de validação: precisão e linearidade

Precisão

| Parâmetro | Concentração (ppb) | | | | | |
|-------------------|--------------------|------|-------|-------|--------|-------|
| | 50,00 | | 75,00 | | 110,00 | |
| intra-dia | média | 92,9 | Média | 109,1 | média | 110,9 |
| | DP | 4,8 | DP | 3,5 | DP | 3,2 |
| | DPR | 5,2 | DPR | 3,3 | DPR | 2,8 |
| entre-dias | média | 94,3 | Média | 103,1 | média | 107,0 |
| | DP | 2,0 | DP | 8,4 | DP | 5,5 |
| | DPR | 2,1 | DPR | 8,2 | DPR | 5,1 |

Linearidade

| | R ² |
|--------------|----------------|
| Curva 1 | 0,9962 |
| Curva 2 | 0,9955 |
| Curva 3 | 0,9891 |
| Curva 4 | 0,9979 |
| Curva 5 | 0,9937 |
| Curva 6 | 0,9921 |
| Curva 7 | 0,9968 |
| Curva 8 | 0,9949 |
| Curva 9 | 0,997 |
| Média | 0,9948 |

ANEXO 4 – Tabela 9: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias com agulha “tru-cut”: peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$):
(obs: incluída a amostra 12 – “outlier”)

Tecido hepático fresco (biópsias com agulha "tru-cut")

| Amostra | Peso(mg) | Leitura(UA) | CFH (ppm)* |
|----------------|--------------|---------------|--------------|
| 1 | 3,88 | 72,9 | 37,58 |
| 2 | 2,89 | 62,6 | 43,32 |
| 3 | 3,45 | 78,3 | 45,39 |
| 4 | 4,04 | 89,85 | 44,48 |
| 5 | 3,74 | 82,6 | 44,17 |
| 6 | 5,39 | 111,3 | 41,30 |
| 7 | 4,23 | 104,9 | 49,60 |
| 8 | 4,52 | 112,75 | 49,89 |
| 9 | 4,36 | 116,35 | 53,37 |
| 10 | 4,25 | 116,95 | 55,04 |
| 11 | 4,92 | 108,15 | 43,96 |
| 12 | 3,51 | 126,05 | 71,82 |
| 13 | 4,18 | 112,3 | 53,73 |
| 14 | 4,77 | 105,95 | 44,42 |
| 15 | 4,81 | 103,5 | 43,04 |
| 16 | 4,41 | 99,25 | 45,01 |
| 17 | 4,34 | 106,6 | 49,12 |
| 18 | 3,77 | 98,95 | 52,49 |
| 19 | 5,09 | 122,75 | 48,23 |
| 20 | 4,5 | 118,45 | 52,64 |
| 21 | 4,33 | 107,3 | 49,56 |
| 22 | 4,17 | 105,35 | 50,53 |
| 23 | 4,81 | 100,6 | 41,83 |
| 24 | 4,99 | 106,1 | 42,53 |
| 25 | 4,02 | 92,05 | 45,80 |
| 26 | 3,79 | 85,85 | 45,30 |
| 27 | 3,73 | 87,15 | 46,73 |
| 28 | 4,68 | 109,9 | 46,97 |
| 29 | 4,99 | 112 | 44,89 |
| 30 | 4,39 | 104,3 | 47,52 |
| Média | 4,30 | 102,03 | 47,68 |
| DesvPad | 0,56 | 14,87 | 6,15 |
| DPR (%) | 13,02 | 14,57 | 12,91 |

* mcg/g de tecido seco

ANEXO 5 – Tabela 10: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias “em cunha” (obs: amostra n° 30=perda); peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$):

Tecido hepático fresco (biópsias "em cunha")

| Amostra | Peso(mg) | Leitura(UA) | CFH (ppm)* |
|----------------|-----------------|--------------------|-------------------|
| 1 | 40,1 | 86,0 | 214,36 |
| 2 | 41,1 | 72,4 | 176,23 |
| 3 | 47,4 | 98,1 | 206,88 |
| 4 | 40,4 | 77,2 | 191,19 |
| 5 | 48,1 | 103,0 | 214,14 |
| 6 | 71,6 | 124,3 | 173,60 |
| 7 | 51,6 | 95,8 | 185,68 |
| 8 | 59,6 | 74,3 | 124,68 |
| 9 | 46,9 | 113,4 | 241,79 |
| 10 | 60,7 | 128,2 | 211,20 |
| 11 | 43,4 | 96,8 | 222,97 |
| 12 | 54,9 | 50,2 | 91,46 |
| 13 | 50,7 | 86,2 | 169,98 |
| 14 | 28,1 | 65,1 | 154,34 |
| 15 | 33,2 | 80,8 | 162,13 |
| 16 | 38,2 | 91,6 | 159,77 |
| 17 | 21,2 | 61,2 | 192,40 |
| 18 | 35,6 | 88,4 | 165,47 |
| 19 | 35,2 | 88,7 | 167,98 |
| 20 | 27,9 | 77,8 | 185,81 |
| 21 | 35,7 | 102,8 | 191,95 |
| 22 | 22,8 | 59,4 | 173,55 |
| 23 | 27,1 | 72,9 | 179,32 |
| 24 | 32,7 | 82,3 | 167,85 |
| 25 | 36,4 | 91,3 | 167,11 |
| 26 | 28,1 | 75,4 | 178,94 |
| 27 | 33,5 | 88,6 | 176,38 |
| 28 | 34,8 | 90,3 | 172,89 |
| 29 | 31,8 | 87,0 | 182,37 |
| 30 | - | - | - |
| Média | 39,96 | 86,53 | 179,39 |
| DesvPad | 11,98 | 17,78 | 28,91 |
| DPR (%) | 29,98 | 20,55 | 16,12 |

* mcg/g de tecido seco

ANEXO 6 – Tabela 11: Dados brutos da quantificação de ferro no tecido hepático de amostras obtidas por biópsias “em cunha” (obs: incluída a amostra 11 – “outlier”); peso (mg), leitura/absorvância (UA) e CFH ($\mu\text{g/g}$):

Tecido hepático conservado em parafina

| Amostra | Peso(mg) | Leitura(UA) | CFH (ppm)* |
|----------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | 17,2 | 72,6 | 281,33 |
| 2 | 37,8 | 80,2 | 141,40 |
| 3 | 28,8 | 97,1 | 224,63 |
| 4 | 26,8 | 85,8 | 213,41 |
| 5 | 29,6 | 79,9 | 179,85 |
| 6 | 25,3 | 86,8 | 228,73 |
| 7 | 24,6 | 93,6 | 253,58 |
| 8 | 29,1 | 68,9 | 157,72 |
| 9 | 17,7 | 53,1 | 199,79 |
| 10 | 16 | 55,1 | 229,39 |
| 11 | 26,8 | 321,0 | 798,43 |
| 12 | 26,3 | 66,9 | 169,54 |
| 13 | 30,6 | 83,7 | 182,36 |
| 14 | 30,6 | 83,5 | 181,88 |
| 15 | 31,7 | 87,5 | 183,89 |
| 16 | 37,7 | 82,1 | 145,20 |
| 17 | 35,1 | 94,1 | 178,63 |
| 18 | 34,3 | 85,1 | 165,46 |
| 19 | 36,7 | 109,1 | 198,16 |
| 20 | 42,9 | 57,0 | 132,91 |
| 21 | 47,1 | 88,1 | 187,07 |
| 22 | 58,7 | 58,1 | 99,05 |
| 23 | 47,1 | 51,5 | 109,36 |
| 24 | 45,6 | 73,1 | 160,22 |
| 25 | 48 | 71,7 | 149,38 |
| 26 | 78,5 | 75,5 | 96,13 |
| 27 | 75,1 | 66,9 | 89,07 |
| 28 | 49,4 | 62,6 | 126,76 |
| 29 | 45,9 | 81,7 | 178,02 |
| 30 | 59,7 | 63,1 | 105,73 |
| Média | 38,02 | 84,5 | 191,57 |
| DesvPad | 15,45 | 46,85 | 123,89 |
| DPR (%) | 40,63 | 55,44 | 64,67 |

* mcg/g de tecido seco

ANEXO 7 – Análise estatística (Teste T para amostras emparelhadas) considerando como critério de exclusão a média da CFH ± 2 DP: excluídos fragmentos n° 11 (“outlier”) e 30 (perda). Reproduzida a partir do programa SPSS v.12.0.®:

T-Test

Paired Samples Statistics

| | | Mean | N | Std. Deviation | Std. Error Mean |
|--------|----------|----------|----|----------------|-----------------|
| Pair 1 | teorAppm | 177,8375 | 28 | 28,18001 | 5,32552 |
| | teorBppm | 172,9614 | 28 | 47,04707 | 8,89106 |

Paired Samples Correlations

| | | N | Correlation | Sig. |
|--------|---------------------|----|-------------|------|
| Pair 1 | teorAppm & teorBppm | 28 | ,339 | ,077 |

Paired Samples Test

| | | Paired Differences | | | | t | df | Sig. (2-tailed) | |
|--------|-------------------|--------------------|----------------|-----------------|---|----------|------|-----------------|-------|
| | | Mean | Std. Deviation | Std. Error Mean | 95% Confidence Interval of the Difference | | | | |
| | | | | | Lower | | | | Upper |
| Pair 1 | teorAppm - teorBp | 4,87607 | 45,91237 | 8,67662 | 12,92689 | 22,67903 | ,562 | 27 | ,579 |

Observações:

- Teor A = CFH no grupo de tecido hepático fresco
- Teor B = CFH no grupo de tecido conservado em parafina

Conclusão: p = 0,579 (não significativo)