

SANDRO LUNEDO



**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA  
METODOLOGIA DE ENZIMAIMUNOENSAIO COM  
MICROPARTÍCULAS PARA A DOSAGEM  
DE FERRITINAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientadora:

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Eliane Merlin Rocha

CURITIBA

2002

SANDRO LUNEDO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DA  
METODOLOGIA DE ENZIMAIMUNOENSAIO COM  
MICROPARTÍCULAS PARA A DOSAGEM  
DE FERRITINAS**

Dissertação apresentada como requisito parcial  
à obtenção do grau de Mestre, pelo Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Pontarolo

Co-orientadora:

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Maria Eliane Merlin Rocha

CURITIBA

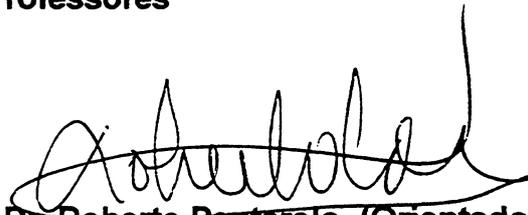
2002

**“Avaliação da sensibilidade e especificidade da metodologia da enzimaensaio com micro-partículas para dosagem de ferritinas”.**

**por**

***SANDRO NELSON LUNEDO***

**Dissertação aprovada como requisito parcial  
para obtenção do grau de mestre no Programa de  
Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, pela Comissão  
formada pelos Professores**



**Prof. Dr. Roberto Pontarolo (Orientador/Presidente)**



**Prof. Dr. Marcos José Machado (Titular/UFSC)**



**Prof. Dra. Almeriane Santos (Titular/UFPR)**

**Curitiba, 22 de março de 2002**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, seus professores e colegas alunos pela oportunidade de crescimento científico e profissional, aos meus orientadores pela dedicação e conhecimentos compartilhados, ao Exército Brasileiro pelo apoio e incentivo, aos meus amigos pelo estímulo e camaradagem e à minha família, em especial à minha esposa Sandra e minhas filhas Olívia e Alice, pelo amor, carinho e compreensão essenciais para a conclusão deste trabalho.

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTO</b> .....	ii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	v
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
1.1 ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE FERRO. ....	04
1.2 FERRITINAS: ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS.....	06
1.3 DIFERENÇAS ENTRE AS FERRITINAS. ....	10
1.4 FERRITINA PLASMÁTICA.....	11
1.5 PATOLOGIAS MAIS COMUNS ENVOLVIDAS COM O ESTOQUE DE FERRO. ....	15
1.5.1 Anemia Ferropriva.....	15
1.5.2 Hemocromatose .....	17
1.5.3 Outros distúrbios de armazenamento de ferro.....	17
1.6 ENSAIOS UTILIZADOS COMO ROTINA PARA DOSAGEM DE FERRITINA. ....	18
1.7 MEDICAMENTOS QUE PODEM LIBERAR FERRO DE FERRITINA. ....	19
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	26
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	29
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	30
4.1 MATERIAL .....	30
4.1.1 Ferritinas Comerciais .....	30
4.2 REAGENTES.....	30
4.2.1 Reagentes que Compõem o Sistema para Dosagem de Ferritina Plasmática (AXSYM – Abbott Laboratories) .....	30
4.2.2 Soro Controle .....	31

4.2.3 Fármacos .....	31
4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FERRITINAS.....	31
4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FÁRMACOS.....	33
4.5 TRATAMENTO DE SORO CONTROLE CONTENDO FERRITINA COM SOLUÇÕES DE FÁRMACOS.....	33
4.6 DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DE FERRITINAS. ....	34
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
5.1 DOSAGENS DE FERRITINAS TECIDUAIS.....	39
5.2 EFEITOS DE FÁRMACOS SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	44
<b>6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS</b> .....	<b>59</b>
6.1 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO MEIA (AXSYM- ABBOTT LABORATORIES) PARA DOSAGENS DE FERRITINAS DE ÓRGÃOS DIFERENTES.....	59
6.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DE FÁRMACOS SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA .....	65
<b>7. CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - FERRITINAS INDIVIDUAIS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	32
TABELA 2 - MISTURAS DE FERRITINAS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES (1:1) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	32
TABELA 3 - MISTURAS DE FERRITINAS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES (1:1:1) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES. ....	32
TABELA 4 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS DE ÓRGÃOS DIFERENTES POR MEIA. ....	39
TABELA 5 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS POR MEIA, EM SOLUÇÕES CONTENDO DOIS TIPOS DE FERRITINAS .....	41
TABELA 6 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS POR MEIA, EM SOLUÇÕES CONTENDO TRÊS TIPOS DE FERRITINAS .....	41
TABELA 7 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	44
TABELA 8 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM METRONIDAZOL SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	50
TABELA 9 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM PARACETAMOL SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	50
TABELA 10 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM ACICLOVIR SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	51
TABELA 11 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	51
TABELA 12 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA (600 µMOL/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA. ....	58

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - CADEIAS H E L ESQUEMATIZADAS FORMANDO O INVÓLUCRO PROTÉICO QUE PROTEGE O NÚCLEO MINERAL (HARRISON E AROSIO, 1996).....	7
FIGURA 2 - REGIÃO CENTRAL HIDROFÍLICA ONDE O NÚCLEO MINERAL E ÁTOMOS DE FERRO SE LIGAM À APOPROTEÍNA (HARRISON E AROSIO, 1996).....	9
FIGURA 3 - VARIAÇÕES DOS NÍVEIS DE FERRITINA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ESTADOS PATOLÓGICOS (LIPSCHITZ et al., 1974).....	14
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA DE REAÇÕES IMUNOENZIMÁTICAS. (AXSYM SYSTEM – ABBOTT LABORATORIES – MANUAL DO USUÁRIO Nº 3).....	36
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA ÓTICO UTILIZADO NA METODOLOGIA. (AXSYM SYSTEM – ABBOTT LABORATORIES – MANUAL DO USUÁRIO Nº 3).....	37
FIGURA 6 - DOSAGENS DE FERRITINAS DE DIFERENTES TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS.....	40
FIGURA 7 - DOSAGENS DE SOLUÇÕES CONTENDO COMBINAÇÕES DE FERRITINAS DE DOIS DIFERENTES TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS.....	42
FIGURA 8 - DOSAGENS DE SOLUÇÕES CONTENDO COMBINAÇÕES DE FERRITINAS DE TRÊS DIFERENTES TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS.....	43
FIGURA 9 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (50 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	45
FIGURA 10 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (100 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	46
FIGURA 11 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (200 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	47
FIGURA 12 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (400 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	48
FIGURA 13 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (600 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	49
FIGURA 14 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM FÁRMACOS (50 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	52
FIGURA 15 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM FÁRMACOS (100 µmol/L) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	53

FIGURA 16 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM FÁRMACOS (200 $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	54
FIGURA 17 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM FÁRMACOS (400 $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	55
FIGURA 18 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM FÁRMACOS (600 $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	56
FIGURA 19 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	57
FIGURA 20 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA (600 $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	– ácido 5'-aminolevulínico
AMP	– adenosina monofosfato
AMP cíclico	– adenosina 3', 5' monofosfato
ATP	– adenosina trifosfato
DMF	– dimetilformamida
DNA	– ácido desoxirribonucléico
EIA	– enzima imunoensaio
ERF	– elemento responsivo de ferro
EROS	– espécie reativa de oxigênio
FMNH <sub>2</sub>	– riboflavina 5' fosfato reduzida
H e L	– subunidades polipeptídicas pesada (do inglês Heavy ou Heart) e leve (Light ou Liver)
kDa	– quiloDalton
MEIA	– ensaios imunoenzimáticos com micropartículas
mol/L	– mol por litro
NADH <sub>2</sub>	– nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
OMS	– organização mundial da saúde
PCR	– proteína C reativa
PRF	– proteínas reguladoras de ferro
rdw	– amplitude de distribuição dos eritrócitos
RNA <sub>m</sub>	– ácido ribonucléico mensageiro
SIDA	– síndrome da imunodeficiência adquirida
TNF	– fator de necrose tumoral
TRIS	– tri (hidroximetil) - aminometano

## RESUMO

A deficiência de ferro é uma das alterações nutricionais mais comumente observada nos seres humanos, apresentando um espectro entre a depleção sem comprometimento fisiológico, até a anemia com inúmeras conseqüências nos mais variados órgãos e sistemas. A ferritina é a principal proteína envolvida no armazenamento de ferro, sendo encontrada no meio intracelular e também como um constituinte normal do plasma, fluídos corporais e das hemácias circulantes. Ferritinas derivadas de diferentes tecidos apresentam distintas propriedades como: estrutura primária, teor de fosfato no núcleo mineral, mobilidade eletroforética e proporção relativa de subunidades H e L, determinando diferenças estruturais, imunológicas, em ponto isoelétrico e capacidade oxidativa. Estudos demonstram a relação direta entre a concentração de ferritina no soro e os estoques de ferro nos tecidos. A síntese de ferritina plasmática pode ser estimulada por citoquinas, sendo que níveis séricos apresentam-se aumentados em pacientes com doenças inflamatórias, comprometendo a avaliação dos níveis reais de ferro intracelular. Os sistemas comerciais disponíveis para a dosagem de ferritina plasmática nos laboratórios clínicos, estão baseados em ensaios imunoenzimáticos utilizando anticorpos antiferritina específicos ligados à enzimas. Alguns agentes quelantes ou redutores, sendo muitos destes medicamentos, têm capacidade de liberar ferro da ferritina e também de ligar-se à estrutura proteica, promovendo possíveis alterações estruturais, inclusive do sítio antigênico, o que poderia, no caso da ferritina, afetar o reconhecimento pelos anticorpos. Neste trabalho avaliamos se a metodologia de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), do sistema ASXYM – Abbott Laboratories, quantifica adequadamente ferritinas em função do tecido de origem (baço, fígado e coração), e se alguns medicamentos, especialmente de uso prolongado, podem influenciar na metodologia. Os resultados das dosagens de ferritinas teciduais indicaram especificidade e sensibilidade para ferritina de baço (93 a 100 %), porém não quantificando adequadamente as ferritinas de fígado (10 %) e coração (0 %). No estudo de possível interferência causada por medicamentos (nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina), observou-se que em concentrações específicas de fármaco e proteína ocorre interferência significativa da ciprofloxacina na metodologia e, como conseqüência, nos resultados.

## ABSTRACT

Iron deficiency is the most common nutritional human disorder, and its clinical manifestations range from slight abatement to severe features. Ferritin is the main protein involved in iron storage, and it is also found in plasma. There are tissue specific ferritins, with different properties as primary structure, phosphate ratio at mineral core, electrophoretic mobility, variable proportion of H and L monomers, which lead to different structural, immunological, isoelectric point and oxidation activity characteristics. Studies exhibited a direct relation between plasmatic ferritin concentration and tissue storage. The plasmatic ferritin synthesis may be stimulated by inflammatory cytokines, which may mislead the true tissue iron concentration. The ferritin measurement is based upon enzymatic immunoassays using specific antiferritin antibodies linked to enzymes. This present work intended to evaluate the microparticle enzyme immunoassay (MEIA) in measuring ferritin concentration from different origins as spleen, liver and heart, as well as trying to check whether some drugs may affect the results. The ferritin tissue measurement data disclosed, using this method, high specificity to spleen ferritin (93 to 100 %), moderate to liver ferritin (10 %) and absence to heart ferritin (0 %). The study showed no interference for drugs used in this work: nitrofurantoin, metronidazole, paracetamol and acyclovir but suggests that in specific concentrations and incubation time cyprofloxacin did affect the results.

## 1 INTRODUÇÃO

A grande disponibilidade natural associada ao fato de apresentar dois estados redox interconversíveis confere ao ferro importância evolutiva, considerando o fato de participar ativamente de uma variedade enorme de reações biológicas. A importância do ferro em funções vitais do metabolismo celular faz com que as células apresentem uma necessidade absoluta de ferro, sendo sugerido, inclusive, que reações catalisadas por este íon possam ter feito parte das primeiras etapas na origem da vida (WÄCHTERSCHÄUSER, 1992). As funções do íon podem ser exercidas tanto na forma de numerosas proteínas que não contém heme, como também no complexo de protoporfirinas das hemoproteínas. A função primordial do ferro no crescimento e replicação celular deve-se ao fato de que muitas proteínas contendo ferro catalisam reações essenciais envolvidas no metabolismo energético (citocromos, aconitase mitocondrial, proteínas Fe-S da cadeia de transporte de elétrons), respiração (hemoglobina e mioglobina), e na síntese de DNA (ribonucleotídeo redutase). Adicionalmente, proteínas contendo ferro são requeridas para o metabolismo de colágeno, tirosina e catecolaminas (RICHARDSON & PONKA, 1997).

Além dos aspectos anteriormente citados, o estudo do armazenamento e distribuição de ferro ganhou importância considerando que, em condições fisiológicas, o ferro encontra-se principalmente na forma oxidada, ligado à proteínas ou ligado à pequenas moléculas como, por exemplo, citrato e ATP. A ligação do ferro à estas moléculas é necessária porque se ele não estiver apropriadamente estabilizado pode participar de reações de transferência de elétrons, que originam a produção de radicais livres tóxicos (RICHARDSON & PONKA, 1997). Nos últimos anos numerosas propriedades e atividades do ferro relacionadas com estados patológicos têm sido identificadas e pesquisadas, buscando o entendimento dos mecanismos na coordenação da utilização e armazenamento do ferro. Estudos recentes têm indicado o envolvimento do ferro na lesão celular mediada por radicais livres, bem como sua ligação com o metabolismo do monóxido de nitrogênio (RICHARDSON & PONKA, 1997).

Alguns microorganismos secretam agentes quelantes de ferro com alta afinidade, conhecidos como siderófilos, enquanto os organismos superiores desenvolveram proteínas ligantes de ferro conhecidas como transferrina, que é a principal proteína transportadora de ferro, e proteínas de estoque deste elemento – as ferritinas.

Segundo HARRISON & AROSIO (1996) a habilidade para seqüestrar ferro confere à ferritina dupla função, detoxificação de espécie reativa de oxigênio (EROS) e reserva deste elemento.

A atividade protetora da proteína está baseada na capacidade de transformar a forma altamente tóxica de  $Fe^{2+}$ , envolvida na geração de espécies reativas de oxigênio, em  $Fe^{3+}$ , e protegê-la pelo envoltório de apoproteína (RICHARDSON & PONKA, 1997). As ferritinas são encontradas no meio intracelular nos tecidos, mas também trata-se de um constituinte normal do plasma, fluidos corporais e das hemácias circulantes (ADDISON *et al.*, 1972).

Ferritinas derivadas de diferentes tecidos de algumas espécies apresentam distintas propriedades como: estrutura primária, teor de fosfato no núcleo mineral, mobilidade eletroforética e proporção relativa de subunidades H e L, determinando assim diferenças estruturais, em ponto isoelétrico e capacidade oxidativa (MUNRO & LINDER, 1978; TREFFRY *et al.*, 1987; AISEN & LISTOWSKI, 1980).

Vários agentes endógenos e xenobióticos redutores têm capacidade de liberar  $Fe^{2+}$  da ferritina ( $Fe^{3+}$ ) *in vitro* (MONTEIRO *et al.*, 1989; FUNK *et al.*, 1985; JONES *et al.*, 1978), inclusive o ALA (OTEIZA *et al.*, 1995), sendo alguns destes produtos utilizados como medicamentos. Outros medicamentos são conhecidos por promoverem danos à proteínas, sendo alguns deles utilizados de forma contínua como o aciclovir nos casos de AIDS, paracetamol nos casos de dores reumáticas crônicas, ou mesmo a ciprofloxacina, indicada atualmente na profilaxia e tratamento das infecções causadas pelo *Bacillus anthracis*, utilizado como arma biológica (MELO, 1999; CDC, 2001).

A deficiência de ferro é uma das alterações nutricionais mais comumente observada nos seres humanos, apresentando um espectro entre a depleção sem

comprometimento fisiológico, até a anemia por deficiência de ferro, com inúmeras conseqüências nos mais variados órgãos e sistemas. Apresenta-se com maior prevalência na infância e em mulheres na faixa etária compreendida entre a puberdade e a menopausa, principalmente nas gestantes. Dados epidemiológicos indicam a estreita relação estabelecida entre a deficiência nutricional de ferro e as condições sócio-econômicas da população, implicando na implementação de programas de assistência que previnam, detectem e tratem a deficiência de ferro (DEMAEYER, 1989).

Estudos demonstram a relação direta entre a concentração de ferritina no soro e os estoques de ferro nos tecidos, sendo utilizado como um parâmetro auxiliar no diagnóstico da deficiência de ferro. Níveis séricos usualmente apresentam-se aumentados em pacientes com doenças inflamatórias, como por exemplo na artrite reumatóide, o que pode acarretar comprometimento na avaliação dos níveis reais de ferro intracelular. Elevações também podem ser um indicador não específico de patologias graves em curso, como carcinoma hepatocelular, leucemias, doença de Hodgkin's, câncer de cabeça e pescoço, bem como em doenças renais, na AIDS e outras infecções e inflamações sistêmicas (LEE & MEANS, 1995).

Os sistemas comerciais disponíveis para a dosagem de ferritina plasmática nos laboratórios clínicos, estão baseados em ensaios imunoenzimáticos, imunoquimioluminescentes, radioimunoenzimáticos e imunoabsorventes, utilizando anticorpos antiferritina específicos.

Deve-se considerar então que as reações utilizando anticorpos monoclonais, de tecidos de baço ou fígado de animais ou humano, observadas nas etapas de desenvolvimento dos testes, poderiam ser afetadas por possível variação na estrutura da apoproteína, em função da origem dos tecidos, ou mesmo por modificações promovidas por estados patológicos ou alguns fármacos utilizados no tratamento destas doenças.

## 1.1 ABSORÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE FERRO

No organismo humano o ferro está presente em todas as células e desempenha inúmeras funções essenciais, como no transporte de oxigênio pela hemoglobina, como facilitador do uso e estoque do oxigênio no tecido muscular na forma de mioglobina, na cadeia de transporte de elétrons nos citocromos e como integrante de reações enzimáticas em diversos tecidos. Níveis insuficientes de ferro podem interferir nestes mecanismos, conduzindo o organismo a estados patológicos que implicam na necessidade de assistência para o diagnóstico e tratamento.

O nível total de ferro no organismo varia de  $2,3 \pm 0,4$  gramas para mulheres e  $3,8 \pm 0,7$  gramas para homens, equivalendo a uma concentração de  $42 \pm 4$  e  $50 \pm 4,5$  mg/kg, respectivamente de peso corporal (BOTHWELL, 1995). Quando o organismo possuir níveis de ferro suficientes para atender suas necessidades, a maior parte, cerca de 70 %, é classificado como ferro funcional, o restante como de transporte ou de estoque. Mais de 80 % do ferro funcional no organismo é encontrado nos eritrócitos como hemoglobina. A mioglobina e as enzimas respiratórias intracelulares completam a atividade. O ferro é armazenado basicamente como ferritina, sendo também encontrado como hemossiderina, e transportado no sangue pela transferrina (BOTHWELL, 1995).

Os níveis de ferro são estabelecidos pelas relações entre a quantidade absorvida, eliminada e armazenada. A regulação dos níveis de ferro ocorre principalmente através da absorção pelo trato gastrointestinal. Quando o mecanismo de absorção atua normalmente, o indivíduo mantém os níveis funcionais e estabelece os níveis de estoque. A capacidade do organismo de absorver ferro da dieta depende dos níveis de ferro no organismo, da taxa de produção de eritrócitos, da quantidade e da forma de ferro na dieta, além da presença de inibidores ou ativadores de absorção na dieta.

A porcentagem de ferro absorvido (biodisponibilidade), pode variar de 1 % a mais de 50 % (HALLBERG, 1981). O principal fator controlador da absorção é a

quantidade de ferro armazenada no organismo. O trato gastrointestinal aumenta a absorção quando os estoques estão abaixo dos níveis necessários e diminui quando o estoque é suficiente. Um aumento nas taxas de produção de eritrócitos pode estimular marcadamente a absorção do mineral (BOTHWELL, 1995; SKIKNE & BAYNES, 1994). Em adultos a absorção dietária de ferro é de aproximadamente 6 % para homens e de 13 % para mulheres em idade fértil (HALLBERG, 1981). A elevada eficiência do mecanismo de absorção nas mulheres reflete, principalmente, os baixos estoques de ferro em decorrência das perdas na menstruação e da utilização aumentada na gravidez. Em pacientes com deficiência de ferro as taxas de absorção também são elevadas (FINCH & COOK, 1984). O nível de absorção, cujo mecanismo ainda não foi totalmente esclarecido, parece estabelecer uma relação com os estoques totais no organismo, sendo observado maior absorção em indivíduos com deficiência de ferro.

Na mucosa gastrointestinal, a ferritina desempenha uma função reguladora da entrada de ferro no organismo, sequestrando ferro que, posteriormente, é perdido na descamação destas células. Contudo, o nível de ferritina no trato gastrointestinal não é excepcionalmente elevado nos casos de altas concentrações de ferro na ingesta (SKIKNE *et al.*, 1995). Somente 1 mg de ferro é absorvido por dia em adultos normais, representando apenas 10 % da ingesta alimentar. A biodisponibilidade de ferro depende da composição da dieta, sendo que quando ingerido na forma de heme apresenta uma absorção duas ou três vezes maior que em outras formas (HALLBERG, 1981; SKIKNE & BAYNES, 1994). O mecanismo de reaproveitamento do ferro pode ser observado pelo fato que 95 % do ferro utilizado para a produção de eritrócitos pela hematopoiese em adultos é proveniente da destruição fisiológicas das células vermelhas, e somente 5 % é baseado na utilização de ferro originário da dieta alimentar. Em contraste, observa-se nas crianças uma utilização de até 30 % de ferro proveniente da dieta (DALLMAN *et al.*, 1980). As perdas diárias de ferro são de aproximadamente 1 mg, ocorrendo principalmente através das fezes, descamação de mucosas e células da pele (GREEN *et al.*, 1968).

Os principais órgãos envolvidos no armazenamento de ferro são o fígado (cerca de um terço), o baço e a medula óssea.

Na medula óssea o metabolismo do ferro é dominado por seu papel na síntese da hemoglobina. Nesse processo, o ferro é usado vezes seguidas, descrevendo um ciclo cujo elemento central é o compartimento de ferro plasmático representado pela transferrina. O ferro move-se do plasma para as células imaturas da medula óssea, onde é incorporado à hemoglobina. Quando a síntese está completa, o ferro, agora na forma de hemoglobina nos corpúsculos vermelhos maduros, é distribuído à circulação. Após o ciclo de vida de 120 dias, as hemácias são fagocitadas pelos macrófagos, principalmente no baço, e o ferro é extraído da hemoglobina. Parte deste ferro pode permanecer armazenado nos macrófagos como ferritina ou hemossiderina, mas a maior parte é levada ao plasma, onde se liga à transferrina completando o ciclo (LEE *et al.*, 1998).

Sob condições patológicas (aumento de ferro ou deficiência de transferrina), a quantidade de ferro não ligado à transferrina pode acarretar problemas. A distribuição de ferro para os tecidos de uma forma inapropriada, pode elevar os níveis de ferro em órgãos parenquimatosos como fígado e pâncreas (CRAVEN *et al.*, 1987) e, nestas condições, o  $\text{Fe}^{3+}$  pode formar complexos ligando-se ao citrato, ao nitriloacetato e a outros compostos, facilmente encontrados em culturas de hepatócitos de ratos (RICHARDSON & PONKA, 1997). As ferritinas também podem transportar significantes quantidades de ferro entre células de Küpffer e hepatócitos (SIBILE *et al.*, 1988).

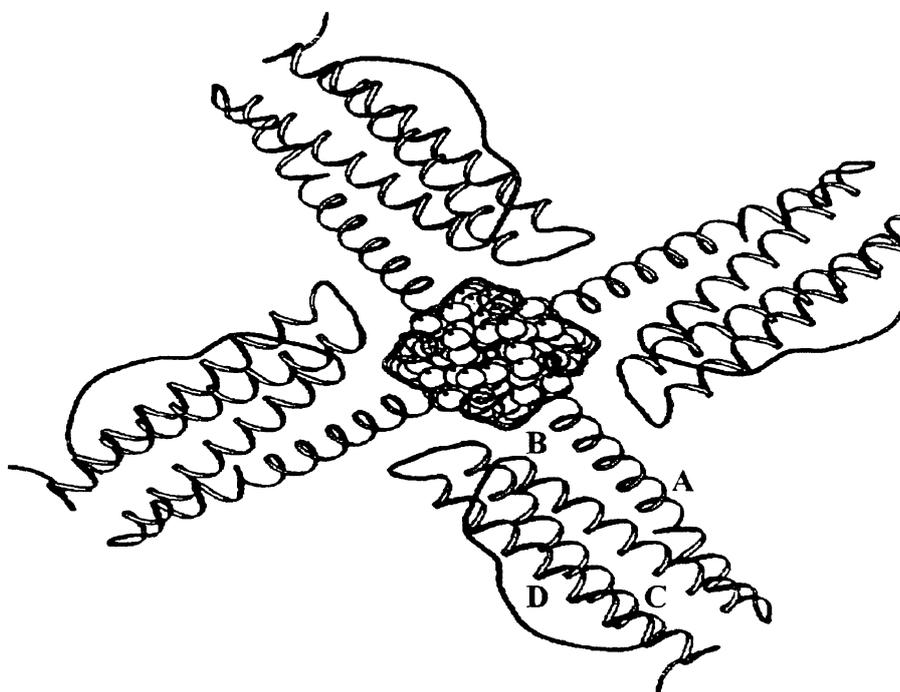
## 1.2 FERRITINAS: ESTRUTURA E CARACTERÍSTICAS

A ferritina é composta por um polipeptídeo externo (apoproteína) e um núcleo mineral. Com peso molecular de aproximadamente 460 kDa, é a principal proteína envolvida no armazenamento de ferro no organismo, tendo sido isolada de um amplo espectro de amostras animais e vegetais. A apoproteína, com 13 nm de diâmetro, é formada por 24 subunidades de três tipos distintos de cadeias polipeptídicas: cadeia pesada-H (21 kDa), cadeia leve-L (19 kDa) e cadeia glicosilada-G (23 Kda) no plasma, agrupadas em 06 (seis) grupos de 04 (quatro) unidades (figura 1), em

proporções variáveis, originando diversas isoproteínas com características imunológicas diferentes (HARRISON & AROSIO, 1996).

Centrados em cada grupo de unidades polipeptídicas, existem 06 (seis) canais (poros) de comunicação entre o centro da apoproteína e a superfície externa, por onde o  $\text{Fe}^{2+}$  e outras pequenas moléculas podem ser transportadas (HARRISON *et al.*, 1991). A cadeia protéica de cada monômero é composta por quatro filamentos helicoidais, longos e paralelos, designados A, B, C e D (figura 1), dois segmentos helicoidais designados E e P, e elementos de ligação não helicoidais (BOYD *et al.*, 1985). Os segmentos E e P podem ser os locais onde ocorre a ligação e oxidação do  $\text{Fe}^{2+}$ , assim que transportado através dos poros (canais) (DESIDERI *et al.*, 1991).

FIGURA 1 - CADEIAS H ESQUEMATIZADAS FORMANDO O INVÓLUCRO PROTÉICO QUE PROTEGE O NÚCLEO MINERAL



As hélices, compostas pelos filamentos A, B, C e D representam as quatro subunidades de cadeia H de ferritina humana formando o envoltório com dobras simétricas axiais, envolvendo átomos de carbono, oxigênio e nitrogênio e o núcleo mineral, representados pelas esferas.

FONTE: HARRISON E AROSIO, 1996.

A sequência completa de aminoácidos tem sido determinada para monômeros de ferritina de muitas espécies, incluindo cadeias H e L de ferritinas humanas (AROSIO *et al.*, 1986). Os monômeros H da apoferritina contém 182 aminoácidos e os monômeros L, 174 aminoácidos. Existem portanto, diferenças funcionais entre as duas subunidades. Uma das diferenças entre as cadeias H e L que pode influenciar na avidéz por ferro é a distribuição de resíduos hidrofílicos. Cadeias L possuem 15 (quinze) resíduos hidrofílicos, enquanto as cadeias H, somente 7, apresentando uma ligação ferro-histidina nos poros intermonoméricos, enquanto os monômeros L não. Portanto, apoferritinas ricas em cadeias H podem captar ferro mais rapidamente, mas o retém com menor avidéz que apoferritinas compostas predominantemente por cadeias L (BAUMINGER *et. al.* 1994, BAUMINGER *et. al.* 1991, WADE *et al* 1991).

A ferritina apresenta atividade enzimática de ferroxidase, considerando a elevada capacidade de oxidar  $Fe^{2+}$  em  $Fe^{3+}$ , formando o complexo cristalino de hidróxido férrico associado com fosfato  $(FeOOH)_8 (FeOOPO_3 H_2)$ , no centro da proteína com 8 nm de diâmetro (figura 2) (FORD *et al.*, 1984; HARRISON *et al.*, 1991). Quando totalmente saturada a ferritina contém 20 % de seu peso em ferro (até 4500, normalmente 3000 átomos de ferro) (FAIRBANKS *et al.*, 1971), contudo, esta relação ferro: proteína não é constante, considerando que a proteína tem a capacidade de armazenar ou liberar ferro em função das necessidades orgânicas.

Outros íons metálicos não férricos, alguns deles tóxicos como alumínio e berílio, também podem ligar-se á ferritina, considerando seu possível transporte pelos canais (poros) da proteína, que, atuando desta forma, passa a apresentar atividade desintoxicante. (MILES *et al.*, 1974).

A sequência de DNA dos genes da ferritina humana tem sido elucidada, sendo expressados pelos cromossomos 11 e 19, respectivamente para as cadeias H e L, onde a regulação da síntese está sujeita ao controle pós-transcricional (ZÄHRINGER *et al.*, 1976 e AZIZ & MUNRO, 1986). A homeostase celular do ferro é regulada pelos receptores de transferrina e pela síntese da ferritina, que ocorre a nível translacional e mediada pelas proteínas reguladoras de ferro (PRF 1 e 2) (CAZZOLA & SKODA, 2000). Em células de fígado de rato a maioria dos RNAm de cadeias H e L para

ferritina encontram-se na forma livre, não associada aos polirribossomos. Quando o ferro é administrado, este pool de RNAm adere-se aos polirribossomos e a síntese de ferritina aumenta (ROGERS & MUNRO, 1987). Este controle envolve a transferrina, que é uma proteína transportadora de ferro e seus receptores, bem como uma região do RNAm, das cadeias L e H da ferritina, conhecida como ERF (elemento responsivo de ferro), que se liga às moléculas reguladoras PRF 1 e 2 (proteínas reguladoras de ferro 1 e 2). Células deficientes de ferro contém níveis elevados de PRF1 ativada, que forma complexos estáveis com o ERF. Quando a PRF liga-se ao 5' ERF do mRNA da ferritina, ocorre o bloqueio da transcrição, em função da não associação do mRNA com os polirribossomos (RICHARDSON & PONKA, 1997).

FIGURA 2 - REGIÃO CENTRAL HIDROFÍLICA ONDE O NÚCLEO MINERAL E ÁTOMOS DE FERRO SE LIGAM À APOPROTEÍNA



Cavidade central da apoproteína onde o núcleo mineral ( $\text{Ca}^{+2}$  ligado a seis carboxilatos) e átomos de ferro ligam-se com resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos representados pelas esferas numeradas (131, 134).

FONTE: HARRISON E AROSIO. 1996

### 1.3 DIFERENÇAS ENTRE AS FERRITINAS

Ferritinas de vertebrados, entre eles o homem, cavalo, ovelha, coelho, rato, foram caracterizadas com o seqüenciamento parcial ou total de amino ácidos. Em alguns invertebrados, inclusive no *Schistosoma mansoni*, também foram isoladas duas ferritinas com diferentes estruturas primárias (DIETZEL *et al.*, 1992). As plantas armazenam ferro como ferritina nos plastídeos, principalmente em tecidos que apresentam baixa atividade fotossintética (BRIAT *et al.*, 1989). Seqüências completas de amino-ácidos são conhecidas em ferritinas de diferentes bactérias, entre elas a *Escherichia coli* e o *Mycobacterium leprae* (IZUHARA *et al.*, 1991). Nos mamíferos as duas seqüências das cadeias H e L de ferritina apresentam identidade em 54 % dos casos, onde cerca de 90 % dos resíduos de cadeia L e 85 % dos resíduos de cadeia H são idênticos (BOYD *et al.*, 1985).

Ferritinas isoladas de tecidos de mamíferos consistem em uma mistura de iso-ferritinas com uma ampla variação na composição das subunidades como também no conteúdo de ferro (AROSIO *et al.*, 1978). Em humanos, cada tecido apresenta ferritina com características próprias. Através de dados obtidos com imunoenaios, utilizando-se anticorpos específicos para cadeias H e L, observou-se que em alguns tecidos e no plasma a distribuição predominante de cadeias H e L nas ferritinas é a seguinte: músculo (20H : 4 L), fígado e baço (2-3H : 22-21 L), ferritina plasmática (0-1H : 24-23 L - glicosilada). (RIGGIERI *et al.*, 1984; CAZZOLA *et al.*, 1997).

Ferritinas com ponto isoelétrico entre pH 4,8 e 5,8 tem sido observadas. Ferritinas ácidas contém uma elevada proporção de cadeias H, enquanto as básicas são ricas em cadeias L. As ácidas são características de tecido cardíaco, placentário e renal, também sendo encontradas em linfócitos, monócitos e precursores dos eritrócitos. Ferritinas básicas, portanto com predomínio de cadeias L, são encontradas particularmente no fígado e baço. Em geral, ferritinas ricas em cadeias L são características de órgãos de estoque de ferro, e contém elevado conteúdo do átomo (cerca de 1500 átomos/molécula). Algumas diferenças entre ferritinas também têm sido observadas em associação com certas patologias. Na hemocromatose idiopática,

as ferritinas ácidas em coração, rins e tecidos pancreáticos diminuem severamente, aparentemente ocorrendo diminuição também em fígado e baço. Em muitos tipos de câncer, em contraste, os tecidos com características de malignidade são ricos em ferritinas ácidas (AROSIO *et al.* 1977),.

HAZARD *et al.*, (1977) verificaram também estas diferenças utilizando anticorpos gerados em coelhos contra ferritina de fígado humano e em cobaias contra ferritina de células HeLa, utilizando radioimunoensaio, donde concluíram que os resultados eram afetados pela composição das subunidades das amostras de ferritina bem como pela natureza dos anticorpos antiferritina. CRICHTON *et al.*, (1973) utilizaram ferritinas de fígado e baço de cavalo e de humanos em análises de imunodifusão e concluíram que as apoferritinas presentes são órgão e espécie específicas. HALLIDAY (1982) utilizou vários métodos imunológicos de determinação da concentração da ferritina sérica e detalhou alguns dos principais problemas encontrados relacionados com a estrutura da molécula da ferritina. Entre as metodologias utilizadas pelo autor estão métodos imunorradiométricos e ELISA. Portanto, alguns autores já relataram a existência de diferenças imunológicas encontradas entre populações de isoferritinas de vários tecidos utilizando outras metodologias, porém não a utilizada neste trabalho.

#### 1.4 FERRITINA PLASMÁTICA

Inicialmente a ferritina foi considerada como uma proteína intracelular nos tecidos, contudo, com ensaios imunorradiométricos desenvolvidos por ADDISON *et al.*, (1972) e modificado por MILES *et al.*, (1974), foi demonstrado que a ferritina é também um constituinte normal do soro humano e das hemácias circulantes. As ferritinas extracelulares encontradas no plasma e líquidos corporais contabilizam uma pequena parte da ferritina total no organismo. Elas são tipicamente pobres em ferro e suas estruturas variam desde quantidades não detectáveis de subunidades H no plasma (SANTAMBROGIO *et al.*, 1987), até elevadas proporções de cadeias H no leite (AROSIO *et al.*, 1986).

Receptores de ferritina em membranas celulares têm sido descritos em células hepáticas (OSTERLOH *et al.*, 1989), em linfócitos e eritroblastos (FARGION *et al.*, 1992), em adipócitos (RAMM *et al.*, 1994) e em várias outras linhagens celulares (COVELL *et al.*, 1988 e KONJIM *et al.*, 1990), indicando provável envolvimento na ligação e internalização de ferritinas do plasma e outros líquidos intersticiais.

Permanece incerto quantos tipos de receptores de membrana para ferritina existem, mas a maior diferença encontrada entre os de células hepáticas e outros tipos de células é evidente, pois os receptores hepáticos são específicos para cadeias H e L, mesmo entre espécies diferentes (MOSS *et al.*, 1992), enquanto os de linfócitos e células de linhagem são específicos unicamente para cadeias H (FARGION *et al.*, 1992). Os receptores parecem ter diferentes funções como o mecanismos de transporte de ferro e regulação de crescimento celular (BROXMEYER *et al.*, 1981).

Parte da ferritina circulante é provavelmente originária de tecidos e células danificadas (lesão celular), porém, a presença específica de subunidades glicosiladas indica que, sob regulação de ferro e condições inflamatórias, as ferritinas plasmáticas sintetizadas pelo fígado foram ativamente secretadas. Presume-se que as ferritinas séricas são sintetizadas no retículo endoplasmático enquanto as ferritinas de armazenamento intracelular são formadas nos ribossomas livres (MADANI & LINDER, 1992).

Estudos preliminares demonstraram a relação direta entre a concentração de ferritina no soro e os estoques de ferro nos tecidos (JACOBS *et al.*, 1972; JACOBS *et al.*, 1975). Em níveis séricos compreendidos entre 15 e 500  $\mu\text{g/L}$  de ferritina, cada 1 $\mu\text{g/L}$  corresponde a aproximadamente 8 a 10 mg de ferro estocado em adultos ou de 120 a 140  $\mu\text{g/kg}$  de peso corporal (COOK & FINCH, 1979). Os valores de referência relatados para homens adultos são de 90 a 95  $\mu\text{g/L}$ , mulheres adultas (não grávidas) 30 a 35  $\mu\text{g/L}$ . Em pacientes com deficiência de ferro não complicada valores entre 3 a 6  $\mu\text{g/L}$  têm sido relatados. Em casos com estoques excessivos de ferro os valores são usualmente maiores que 1000  $\mu\text{g/L}$  (DALLMAN *et al.*, 1996).

A possibilidade de a ferritina sérica ser secretada e apresentar características de proteínas de fase aguda em estados inflamatórios, regulada por hormônios e níveis

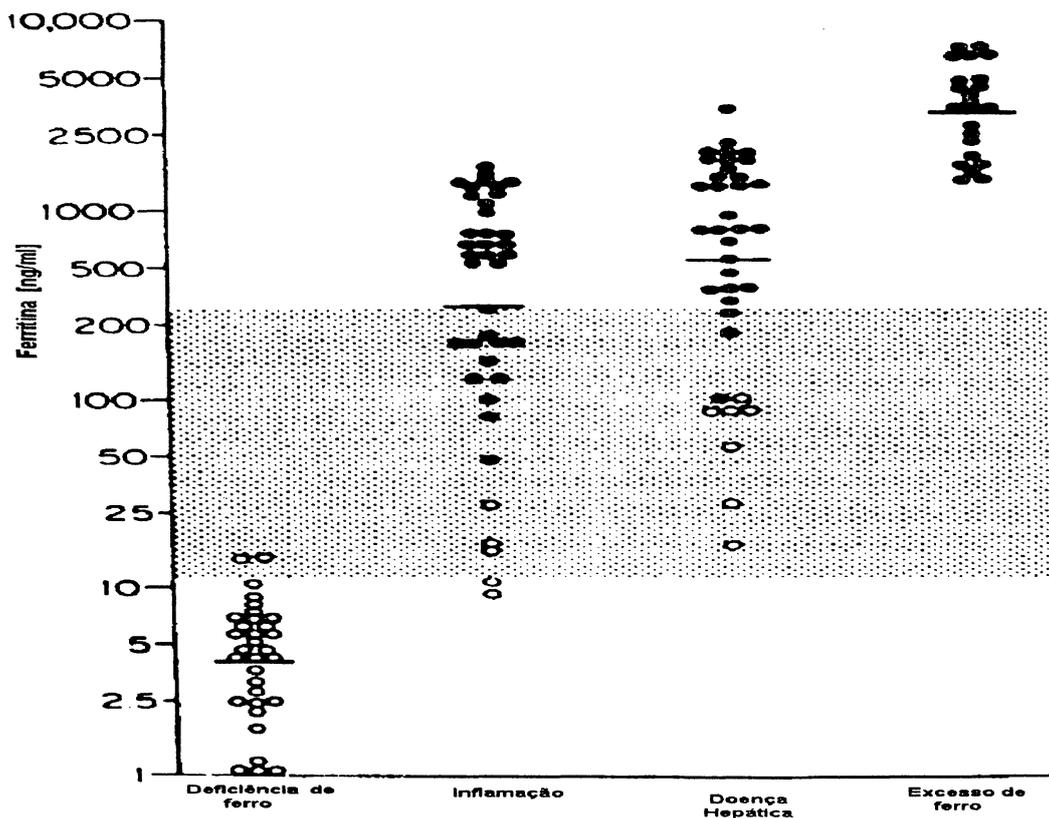
de ferro, foi examinada, como veremos a seguir, em células de linhagem hepática secretoras de proteínas. A adição de interleucina-1 (IL-1) e de fator de necrose tumoral (TNF), são capazes de duplicar a quantidade de ferritina secretada para o meio. Foi observado também aumento significativo com a adição de ferro. No tratamento com citocinas não foi observado aumento nos níveis de ferritina intracelular. Estes resultados mostraram que células hepáticas podem secretar ferritina, que esta atividade é regulada por ferro e citocinas inflamatórias, e que o mecanismo de regulação difere daquele da ferritina intracelular (TRAN *et al.*, 1997). O nível de ferritina sérica em pacientes com anemia e patologia crônica concomitante pode aumentar desproporcionalmente em relação ao aumento dos estoques de ferro (figura 3). Este fenômeno torna mais difícil o diagnóstico de deficiência de ferro quando coexistir com outra patologia. Combinando-se os níveis de ferritina sérica com outros parâmetros, como por exemplo a dosagem de Proteína C Reativa – PCR, não se observa melhora no valor preditivo da dosagem, contudo tem-se indicado a dosagem em paralelo de ferritina de eritrócitos que pode, nesta combinação, ser mais eficiente (BALABAN *et al.*, 1993). Estudos conduzidos por DOMINGO *et al.* (1997), indicaram que a dosagem da ferritina de eritrócitos apresenta melhores resultados na avaliação de anemia por doenças crônicas que os obtidos nas dosagens de ferritina sérica. Apesar desta vantagem diagnóstica específica, os ensaios com ferritina de eritrócitos apresentam aplicação restrita nos laboratórios de rotina, considerando a necessidade de amostras de sangue fresco para preparar amostras de eritrócitos isentas de leucócitos.

Níveis de ferritina sérica (secretada e glicosilada), usualmente aumentam em pacientes com doenças inflamatórias e elevações extremas podem ser um indicador não específico de patologias graves em curso, podendo ser observado na terapia transfusional, infecções crônicas, leucemias, doença de Hodgkin, câncer de cabeça e pescoço, ovários, pâncreas, mama, fígado e neuroblastoma. A dosagem de ferritina no carcinoma hepatocelular é particularmente importante, especialmente quando combinado com a determinação de alfa-fetoproteínas (COHEN *et al.*, 1981). A dosagem da ferritina também proporciona importante parâmetro para a avaliação e

acompanhamento terapêutico do tratamento de talassemias com deferroxamina (agente quelante de ferro) (SCHETTINI *et al.*, 1981).

A dosagem de ferritina é, portanto, quando combinada com outros parâmetros e na ausência de doença inflamatória, um dado complementar para a avaliação de pacientes com deficiência de ferro.

FIGURA 3 - VARIAÇÕES DOS NÍVEIS DE FERRITINA SÉRICA EM FUNÇÃO DE DIFERENTES ESTADOS PATOLÓGICOS



Resultados das determinações de ferritina sérica em deficiência de ferro, estados inflamatórios, doença hepática e excesso de ferro. Círculos em branco representam pacientes com deficiência de ferro (capacidade de ligação de ferro menor que 400  $\mu\text{g}/100\text{ mL}$  e saturação de transferrina menor que 16%). Valores normais estão representados na faixa com fundo escuro.

FONTE: LIPSCHITZ *et al.*, 1974.

## 1.5 PATOLOGIAS MAIS COMUNS ENVOLVIDAS COM ARMAZENAMENTO DE FERRO

A quantidade de ferro no organismo é a soma algébrica da absorção e perda de ferro, estabelecendo uma homeostase onde a excreção e absorção são similares. Sobre uma ampla variação de reservas de ferro corporal, a absorção de ferro geralmente varia inversamente à quantidade de ferro armazenada, considerando ainda que pouco ferro é perdido pois o organismo não possui nenhum mecanismo ativo de excreção.

O conteúdo total de ferro corporal pode ser alterado por perda sangüínea excessiva crônica, má absorção intestinal de ferro, transfusão de hemácias, uma dieta que tenha um conteúdo imprópriamente alto de ferro biodisponível, anemia hemolítica crônica, eritropoese ineficaz ou a presença dos genes da hemocromatose (LEE *et al.*, 1998).

### 1.5.1 Anemia Ferropriva

A deficiência de ferro está entre as doenças orgânicas mais comuns da humanidade, sendo a doença hematológica mais freqüente. É mais comum em crianças, pessoas menos favorecidas sócio-economicamente e mulheres. Nas crianças a deficiência pode ser explicada pelo rápido desenvolvimento físico, quando este não é acompanhado por uma ingesta de ferro compatível com o consumo diário. Nas mulheres a perda de ferro é três vezes maior que nos homens, em consequência da perda menstrual. Nas mulheres em fase de pós-menopausa e nos homens, os sangramentos gastrointestinais crônicos são a causa mais comum de perda de ferro.

A deficiência de ferro é um estado em que o conteúdo de ferro no organismo está abaixo do normal. O primeiro estágio é uma depleção dos depósitos de ferro, mas a concentração do ferro sérico e os níveis de hemoglobina são normais. Nesse estágio a ferritina apresenta valores diminuídos. Um segundo estágio é uma deficiência de ferro sem anemia, caracterizando-se por uma diminuição ou ausência dos estoques de ferro, com diminuição dos níveis de hemoglobina, sem a presença ainda de anemia severa. Nesse estágio a ferritina está diminuída e a concentração de ferro sérico

começa a baixar. O terceiro estágio caracteriza-se pela anemia ferropriva instalada, que é a forma mais avançada da deficiência de ferro. Caracteriza-se por ausência de estoques de ferro, concentração de ferro sérico baixa, capacidade de transporte de ferro aumentada, índice de saturação diminuído, além da diminuição da hemoglobina e do volume globular (BEUTLER *et al.*, 2000).

Quando a anemia é de instalação lenta, como em pacientes com sangramento oculto crônico, os mecanismos homeostáticos permitem ao paciente uma adaptação aos baixos níveis de hemoglobina, não permitindo uma correlação entre a gravidade dos sintomas e os níveis de hemoglobina.

Três fatores principais estão implicados na patogênese da anemia por deficiência de ferro. O primeiro está relacionado com a síntese da hemoglobina, em consequência da redução do suprimento de ferro. O segundo refere-se a defeitos na proliferação celular, e o terceiro e menos importante, com a redução do tempo de vida eritrocitária. Quando a transferrina apresenta níveis de saturação inferiores a 16 %, o suprimento de ferro para a medula é inadequado para atender as quantidades mínimas para a produção da hemoglobina, resultando em anemia microcítica e hipocrômica (BAINTON & FINCH, 1964).

O grupo heme é essencial para todas as células aeróbias e compõe a estrutura da hemoglobina e de outras heme-proteínas como a mioglobina, citocromos, catalase e peroxidase. A estrutura do heme é composta pelo átomo de ferro unido, através do nitrogênio, a quatro anéis pirrólicos de protoporfirina. A biossíntese do heme inicia-se na mitocôndria a partir da condensação da succinil coenzima A com a glicina, formando o ácido 5-delta aminolevulínico. Duas moléculas deste composto são condensadas no citoplasma, formando o porfobilinogênio, uma molécula monopirrólica. A porfobilinogênio deaminase catalisa a condensação de quatro moléculas de porfobilinogênio, formando um composto tetrapirrólico linear. Após etapas intermediárias de descarboxilações e oxidações mediadas por enzimas, a ferro quelatase retira dois átomos de hidrogênio e incorpora o ferro na forma ferrosa, formando a protoporfirina (heme) (BEUTLER *et al.*, 2000). Outras proteínas, além da

hemoglobina, também são reduzidas na deficiência de ferro, algumas delas podendo ser responsáveis por manifestações clínicas e patológicas de doenças.

### 1.5.2 Hemocromatose

A hemocromatose é uma das mais comuns desordens genéticas observadas na população ocidental (SIMON & BRISSOT, 1988), tendo como definição a presença de dois alelos de hemocromatose, herdada como traço recessivo autossômico com cadeia do alelo h à região do HLA (antígeno do leucócito humano), não requerendo a presença de sobrecarga de ferro ou sistomas e sinais da doença (LEE *et al.*, 1998).

Não se conhece o mecanismo pelo qual a presença de dois alelos de hemocromatose resulta excesso de armazenagem corporal. Os genes causam ou absorção de ferro excessiva e prolongada ou falha quanto a reduzir a absorção intestinal de ferro. Está associada com um grande aumento dos depósitos de ferro (até 50 vezes), com predomínio de hemossiderina, no fígado e outros tecidos, em função do anormal aumento da absorção intestinal, embora não ocorra aumento de ferritinas nas células absorptivas duodenais (FRANCANZANI *et al.*, 1989). Estoques elevados também podem ser encontrados como efeito secundário decorrente de eritropoiese ineficiente, como nas talassemias.

As anormalidades laboratoriais mais comuns são a elevação da saturação percentual de transferrina e das concentrações de ferritina sérica, elevada concentração de ferro hepático, elevação sérica de enzimas hepáticas e sinais radiográficos de artropatia (LEE *et al.*, 1998).

### 1.5.3 Outros distúrbios de armazenamento de ferro

Na beta-talassemia major, indivíduos que são homozigotos para beta talassemias têm anemia grave e requerem freqüentes transfusões de hemácias. Eles tornam-se maciçamente carregados de ferro devido à hipertransfusão e excessiva absorção duodenal de ferro relacionado à anemia grave e eritropoese ineficiente. Os

efeitos da sobrecarga de ferro podem levar a insuficiência cardíaca congestiva e insuficiência hepática, cuja terapia adequada com deferoxamina, a longo prazo, resulta em redução das concentrações séricas de enzimas hepáticas e ferritina. Pacientes que são heterozigotos para beta talassemias geralmente não desenvolvem sobrecarga de ferro (LEE *et al.*, 1998).

A aplasia de células vermelhas pode ser uma complicação de distúrbios, tal como lúpus eritematoso ou leucemia linfocítica crônica. Os indivíduos afetados por aplasia de células vermelhas ou anemia aplásica podem requerer muitas transfusões de hemácias implicando em sobrecarga de ferro (LEE *et al.*, 1998).

O tipo refratário idiopático de anemia sideroblástica não tem uma causa identificável, como alcoolismo ou toxicidade por medicação ou substâncias tóxicas. Em geral está associada à elevação moderada de saturação de transferrina, concentração de ferritina sérica e reservas de ferro hepático. Existem evidências que este tipo de anemia sideroblástica ocorre em indivíduos que apresentam tanto o fator sideroblástico não identificado como um ou mais alelos de hemocromatose (LEE *et al.*, 1998).

A síndrome da catarata congênita e hiperferritinemia têm sido relatadas em várias famílias. Esta desordem tem sido atribuída à uma mutação no RNAm da apoferritina. Apesar de não ocorrer sobrecarga de ferro, os níveis séricos de ferritina apresentam concentração de milhares de microgramas/litro, e a ferritina, aparentemente, contém somente cadeias L (CAZZOLA *et al.*, 1997).

## 1.6 ENSAIOS UTILIZADOS COMO ROTINA PARA DOSAGEM DE FERRITINA

A avaliação dos níveis de ferritina plasmática tem se mostrado um útil indicador dos estoques de ferro no organismo, e portanto, um dado auxiliar no diagnóstico das deficiências de ferro e no monitoramento de pacientes com excesso de ferro. O aumento do interesse e da demanda clínica pela dosagem de ferritina, têm fomentado o desenvolvimento de inúmeros sistemas comerciais com esta finalidade.

As metodologias utilizadas nas rotinas dos laboratórios clínicos para a dosagem de ferritina plasmática são baseadas em metodologias de radioimunoensaio, enzimaensaio, imunoquimioluminescência, imunoturbidimetria e os ensaios imunoenzimáticos com micropartículas – MEIA. Estudos realizados por STACY & HAN (1992) indicaram haver um bom grau de concordância entre os métodos, sendo aparentemente equivalentes. As metodologias acima descritas utilizam, como padrões e calibradores, ferritinas de baço humano, de cavalo, coelho ou rato, bem como os anticorpos monoclonais são produzidos a partir de células destes animais (ABBOTT LABORATORIES, 1998; ROCHE LABORATORIES, 1996; STACY & HAN, 1992). Algumas metodologias, não incluídas neste estudo comparativo, utilizam como padrões ferritina de fígado (REVENANT *et al.*, 1985). Outras metodologias tem apresentado melhores resultados nos aspectos de precisão, e reprodutibilidade, como por exemplo a imunoeletroforese e a densitometria contudo, estas metodologias ainda não estão disponíveis comercialmente, sendo utilizadas somente a nível experimental.

Neste trabalho optou-se por utilizar a metodologia MEIA – ensaios imunoenzimáticos com micropartículas (AxSYM – Abbott Laboratories), por ser amplamente utilizado nos laboratórios clínicos de rotina e utilizar metodologia consagrada. Esta metodologia foi avaliada pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards – Estados Unidos da América*), protocolo EP5-T2, e apresentou características de precisão, recuperação, sensibilidade, interferentes e coeficiente de correlação, descritos no informe técnico, dentro dos parâmetros de aceitabilidade.

## 1.7 MEDICAMENTOS QUE PODEM LIBERAR FERRO DE FERRITINA

O processo de liberação de ferro de ferritina pode envolver redução de ferro e ou quelação. Experimentalmente, muitos agentes redutores e ou quelantes que forem suficientemente pequenos para penetrar na apoferritina pelos canais causam liberação de ferro (HARRISON *et al.*, 1994). Quando incubado com agentes redutores como FMNH<sub>2</sub> e NADH<sub>2</sub>, o ferro de ferritina é rapidamente liberado (FUNK *et al.*, 1985).

Estudos cinéticos e espectroscópicos indicaram que alguns agentes quelantes, possivelmente pela formação de complexo ternário, podem retirar ferro do núcleo mineral sem penetrar na proteína (TREFFRY *et al.*, 1997). A capacidade de liberação de ferro foi medida para uma série de compostos orgânicos redutores, indicando que o potencial de redução apresenta melhor correlação com a capacidade de liberar ferro que o tamanho da molécula liberadora (MOORE *et al.*, 1992). O potencial de redução e o tamanho molecular parecem influenciar no processo, indicando que aparentemente não é necessária a penetração do agente no envoltório protéico para retirar ferro do núcleo mineral. Apesar de não encontrarmos estudos que indicassem ocorrer, no processo de perda de ferro, alteração na estrutura da ferritina que implicasse em prejuízo para as dosagens imunoenzimáticas, existe a possibilidade do ferro liberado ser utilizado nas reações de Fenton ou Haber-Weiss ( $\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{+3} + \text{OH}^\cdot + \text{HO}^\cdot$ ) catalizadas por ferro, gerando espécies reativas de oxigênio, especialmente o radical hidroxila, como observado por ROCHA *et al.*, (2000), com o ácido 5-aminolevulínico.

MONTEIRO *et al.* (1989), relatou que inúmeros agentes xenobióticos mediante diversas condições como: anaerobiose, redução prévia com xantina oxidase, sob tensão de nitrogênio ( $\text{N}_2$ ) e radiação UV, apresentam variável capacidade de retirar ferro de ferritina. Compostos nitroaromáticos como nitrofurantoína e metronidazol também mostraram atividade, ainda não estando estabelecido qual o mecanismo de liberação de ferro de ferritina intracelular. Supõe-se que alterações na estrutura da apoproteína sejam necessários para a liberação do ferro. Medicamentos que em sua metabolização induzem a formação de radicais livres, como por exemplo a ciprofloxacina (GÜRBAI *et al.*, 2001), podem atuar sobre as proteínas plasmáticas.

Traremos a seguir as principais características químicas, farmacodinâmicas e farmacológicas, dos medicamentos utilizados em nosso trabalho, que apresentam, segundo a literatura anteriormente citada, possíveis atividades que impliquem em ligação á proteínas, danos estruturais ou liberação de ferro.

#### a) Nitrofurantoína

A nitrofurantoína (1-(5-Nitrofurfurilideneamino) hidantoína), utilizado na terapêutica como antibiótico das vias urinárias, com fórmula molecular  $C_8H_6N_4O_5$ , peso molecular 238,2, ponto de fusão 271 °C, apresenta os seguintes efeitos adversos considerados no presente trabalho: hepatotoxicidade, incluindo raros casos de hepatite medicamentosa, anemia megaloblástica, agranulocitose, metahemoglobinemia (DONOVAN, 1983.) e anemia hemolítica em pacientes com deficiência de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD). A nitrofurantoína também foi considerada inadequada para ser utilizada em pacientes com porfiria aguda, embora os dados experimentais sejam conflitantes (MOFFAT *et al.*, 1986). É rapidamente absorvida quase que completamente após administração oral. Cerca de 40 % da dose é excretada na urina após 24 horas com pequenas quantidades do metabólito aminofurantoína. Após dose oral de 50 mg (a dose usual é de 400 mg diárias), a concentração plasmática observada em média é de 0,43  $\mu\text{g/mL}$  (0,29 a 0,66  $\mu\text{g/mL}$ ) entre 1 e 4 horas (HOENER & PATTERSON, 1981). Os níveis urinários variam entre 50 e 250  $\text{mg/mL}$  e a concentração inibitória mínima, *in vitro*, entre 4 e 100  $\mu\text{g/mL}$ . A meia-vida plasmática é de 30 a 60 minutos, com volume de distribuição de cerca de 0,6 litros/kg, clearance plasmático de 10  $\text{mL/min/kg}$  e com um índice de ligação com proteínas no plasma de cerca de 60 %. É pouco solúvel em água e etanol, sendo solúvel 1:16 em DMF (dimetilformamida) (REYNOLDS *et al.*, 1989).

#### b) Metronidazol

O metronidazol, 2-(2-Metil-5-nitroimidazol-1-il)etanol, fórmula molecular  $C_6H_9N_3O_3$ , peso molecular 171,2, ponto de fusão 162 °C, é solúvel 1:100 em água e 1:200 em etanol, tem sido utilizado como antiprotozoário e também como antibiótico em infecções graves ou por microorganismos anaeróbios. É rapidamente absorvido quase que completamente após administração oral, sendo metabolizado por oxidação em 2-hidroximetilmetronidazol e 2-metil-5-nitroimidazol-1-ácido acético, e por conjugação com ácido glicurônico. Cerca de 70 a 80 % da dose é excretada na urina após 48 horas, e a concentração terapêutica após dose oral de 400 mg foi em média de

6,9 µg/mL (4,5 a 11,6 µg/mL) em 2 horas (JENSEN & GUGLER 1983). Estudos indicaram uma meia-vida plasmática de 8 horas, com um volume de distribuição de cerca de 0,5 a 1,0 litro/kg, com clearance plasmático de 1 mL/min/kg. Menos de 20% do metronidazol se liga à proteínas plasmáticas nos tratamentos convencionais utilizando concentrações acima de 2,4 g diárias durante 10 dias. Os efeitos adversos apresentados na terapêutica com metronidazol de interesse no trabalho são: hepatotoxicidade, com severo aumento de enzimas hepáticas, incluindo casos de hepatite medicamentosa, foram também relatados alguns casos de aplasia medular, com leucopenia, agranulocitose e acentuada redução da eritropoiese, além de inúmeros casos de leucopenia temporária dose dependente. Os dados relatados indicam que o metronidazol deve ser utilizado com grande atenção em pacientes com discrasias sangüíneas ou doença ativa no sistema nervoso central. É recomendado que todos os pacientes que utilizarem o metronidazol em tratamento superior a dez dias, devem ser monitorados e o tratamento deve ser descontinuado ao sinal de qualquer neuropatia periférica ou outros sinais de toxicidade. As dosagens devem ser diminuídas em pacientes com hepatopatias. É sugerido que o uso do metronidazol na terapêutica deva ser evitado durante a gravidez, e pacientes em uso da medicação não devem amamentar (REYNOLDS *et al.*, 1989).

### c) Paracetamol

O paracetamol, 4'-hidroxiacetanilida, com indicação terapêutica de analgésico e antiinflamatório, apresenta fórmula molecular:  $C_8H_9NO_2$ , peso molecular de 151,2 e ponto de fusão 171 °C. É solúvel 1:70 em água e 1:10 em etanol. Tem sido utilizado como o principal substituto do ácido acetilssalicílico, por não causar irritação estomacal e ser aparentemente seguro dentro das dosagens recomendadas. Sua distribuição no organismo obedece as seguintes características: baixas doses são rapidamente absorvidas, sendo que a absorção de doses maiores varia consideravelmente, sendo influenciada inclusive pela taxa de esvaziamento gástrico, presença de comida e hora do dia. A biodisponibilidade é de 70 a 90 %. O paracetamol é amplamente distribuído nos líquidos corporais, sendo encontrado em concentrações

equivalentes na saliva e plasma. É principalmente metabolizado por conjugação formando glicuronídeos e sulfatos etéreos. A ação do citocromo P 540 na metabolização do paracetamol produz uma quinoneimina reativa, que pode atacar proteínas, ligando-se aos grupamentos sulfidrila (-SH) (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999). Aproximadamente 90 % da dose terapêutica é excretada em 24 horas. Estudos para a determinação da concentração terapêutica indicam que após dose oral de 1,8 a 3,6 g, a concentração plasmática foi em média de 23,7 µg/mL (9,9 a 43,3 µg/mL) em 2 horas (HEADING *et al.*, 1973), com meia-vida plasmática de 1,5 a 3 horas. Concentrações plasmáticas, nos parâmetros anteriormente indicados, que perdurarem por períodos acima de 4 horas indicam deficiência na metabolização e possível lesão hepática. Em doses terapêuticas, acima de 4,0 g diárias, apresenta um volume de distribuição em torno de 1,0 litro/kg, com clearance plasmático avaliado em cerca de 5 mL/min/kg. No estudo da capacidade de ligação com proteínas, observa-se que no plasma não há ligação em concentrações menores que 60 µg/mL, ocorrendo de 8 a 40 %, em casos de intoxicação. Os efeitos adversos indicados em nosso levantamento bibliográfico, que são de interesse no trabalho, estão associados com intoxicação medicamentosa, podendo ocorrer lesão (necrose) hepática, tendo sido relatado casos de anemia hemolítica, agranulocitose, trombocitopenia e pancitopenia (REYNOLDS *et al.*, 1989 ; MOFFAT *et al.*, 1986).

#### d) Aciclovir

O aciclovir, 9-(2-Hidroxietoximetil)guanina, utilizado na terapêutica como agente antivirótico com fórmula molecular  $C_8H_{10}N_5O_3$ , peso molecular 247,2, solubilidade em água de 1:10, é amplamente distribuído nos líquidos corporais, inclusive no fluido vesicular, humor aquoso e líquido cefalorraqueano. A biodisponibilidade oral varia de 10 a 30 %, diminuindo com o aumento da dose. A excreção renal, por filtração glomerular e secreção tubular, é a principal via de eliminação do aciclovir não metabolizado. Menos de 15 % são excretados como 9-carboximetoximetilguanina ou outros metabólitos. A concentração terapêutica após dose oral de 800 mg equivale a concentração plasmática média de 1,6 µg/mL em 2

horas. Com administração intravenosa de 10 mg/kg de peso a cada 8 horas a concentração plasmática é de 20,7 µg/mL Na dosagem terapêutica usual de 5,0 a 10 mg/kg a cada 8 horas, a meia-vida plasmática é de 2 a 6 horas. Os principais efeitos adversos de interesse no trabalho são nefrotoxicidade, aumento dos valores de enzimas hepáticas, alterações hematológicas (REYNOLDS *et al.*, 1989; MOFFAT *et al.*, 1986).

#### e) Ciprofloxacina

A ciprofloxacina, [ácido 3-quinolinocarboxílico, 1-ciclopropil-6-fluor-1,4-dihidro-4-oxo-7-(1-piperazinil)-monohidrocloreto-monohidrato], antibiótico sintético pertencente ao grupo dos quinolônicos, solúvel em água na proporção de 1g em 25 mL, com fórmula molecular  $C_{17}H_{18}FN_3O_3 \cdot HCl \cdot H_2O$ , peso molecular 385,82, tem mecanismo de ação decorrente do bloqueio da DNA-girase, resultando em efeito bactericida em um amplo espectro de microorganismos. É efetiva, *in vitro*, contra patógenos Gram-negativos, inclusive *Pseudomonas aeruginosa*, e contra patógenos Gram-positivos, tais como *Staphylococcus* e *Streptococcus*. Em geral, os anaeróbios são menos suscetíveis. A ação bactericida da ciprofloxacina ocorre na fase proliferativa e vegetativa (MELO, 1999; REYNOLDS *et al.*, 1989; MOFFAT *et al.*, 1986). A resistência à ciprofloxacina não é mediada por plasmídeos, se desenvolve lentamente e em estágios, não apresentando resistência paralela com os demais antibióticos não compreendidos nos grupos dos quinolônicos. A ciprofloxacina não deve ser indicada em casos de hipersensibilidade aos derivados quinolônicos, não sendo recomendado seu uso, também, em crianças e adolescentes, já que não há dados que permitam seu uso com segurança nestes pacientes, a não ser que a indicação seja estrita e suplante os riscos de efeitos indesejáveis. Considerando estudos realizados com animais, não é de todo improvável que possa causar danos à cartilagem articular de organismos imaturos. A administração concomitante de ciprofloxacina oral e ferro, antiácidos e medicamentos tamponados, reduz a absorção do antibiótico, necessitando ser administrado duas horas antes ou quatro horas após estes medicamentos. Concentrações séricas máximas são alcançadas 60 a 90 minutos após a administração oral. Pode ser administrado a cada 8 ou 12 horas, conforme indicação clínica. Após a

administração oral de ciprofloxacina, 94 % da dose foi recuperada em cinco dias, 55 % na urina e 39 % nas fezes. Após a administração endovenosa, 7 % da dose administrada é eliminada pela urina e 14 % pelas fezes, sendo mais de 90 % eliminado nas primeiras 24 horas. Os locais infectados (fluidos corporais e tecidos) contém concentrações de ciprofloxacina mais elevadas do que no sangue. A concentração plasmática em 12 horas após administração oral de 500 mg é de 0,2 µg/mL, ocorrendo transformação hepática em quatro novos metabólitos, correspondendo a 15 % da dose. O tempo de meia-vida plasmático é de aproximadamente 4 horas. Como efeitos adversos, além dos indicados anteriormente, também foram observados casos de alterações nos sistemas linfático e sangüíneo, como anemia, leucopenia, granulocitopenia, leucocitose, alterações nos valores de protrombina, trombocitopenia e trombocitose. As soluções de ciprofloxacina apresentam sensibilidade á luz, implicando cuidados em seu manuseio, tanto para administração medicamentosa como em experimentos a serem realizados (MELO, 1999; REYNOLDS *et al.*, 1989 ; MOFFAT *et al.*, 1986). Inúmeros exemplos na literatura indicam que a formação de radicais livres podem estar envolvidos nos mecanismos de alguns dos efeitos adversos, incluindo fototoxicidade e defeitos nas cartilagens (HOOPER *et al.*, 1985; HAYEM *et al.*, 1994). Foi demonstrado que os efeitos fototóxicos estão relacionados com a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (WAGAI *et al.*, 1991). Os estudos de GÜRBAI *et al.* (2001), mostram que a ciprofloxacina, durante sua metabolização nos microssomas hepáticos, induz a formação de radicais livres, sendo esta indução dose e tempo dependente.

## 2. JUSTIFICATIVA

Considerando a aplicação da dosagem de ferritina no diagnóstico, prognóstico e acompanhamento da eficiência terapêutica em anemias e outras patologias, e ainda as características de especificidade e sensibilidade já mencionadas dos sistemas comerciais disponíveis para a dosagem de ferritinas nos laboratórios clínicos, julgamos importante avaliar se a metodologia aplicada apresenta resultados que não sofram variações significativas quando ocorram alterações na estrutura da apoproteína, como pelo uso de alguns medicamentos, bem como avaliar se na presença de ferritinas com características estruturais distintas as reações imunoenzimáticas seriam capazes de detectar tais diferenças, quantificando corretamente a ferritina específica de interesse na amostra, o que iria influenciar diretamente na interpretação dos resultados obtidos por esta metodologia.

Os principais dados observados e relatados na literatura que indicam a importância da investigação são:

- a) A dosagem de ferritina tem sido utilizada como um marcador não específico em diferentes patologias, utilizando-se testes imunológicos que podem ser afetados pela modificação da estrutura protéica (POWELL *et al.*, 1977);
- b) Ferritinas derivadas de diferentes tecidos de algumas espécies apresentam distintas propriedades como: estrutura primária, teor de fosfato no núcleo mineral, mobilidade eletroforética, proporção relativa de subunidades H e L, determinando diferenças estruturais, em ponto isoelétrico e capacidade oxidativa (MUNRO & LINDER, 1978; TREFFRY *et al.*, 1987; AISEN & LISTOWSKI, 1980). Um exemplo disto são ferritinas de baço, fígado e coração de cavalo que possuem peso molecular, fluorescência intrínseca e imunorreatividade que variam em função da proporção relativa de subunidades H e L (STEFANINI *et al.*, 1987);
- c) Algumas ferritinas possuem apenas um resíduo de triptofano por subunidade, sendo que este resíduo e alguns aminoácidos adjacentes poderiam fazer parte do

sítio antigênico (epítipo) da ferritina H humana envolvido nas reações de complexo antígeno-anticorpo (HELMER-CITTERICH *et al.*, 1995). Este fato é importante porque a concentração de ferritina H pode ser seletivamente aumentada pelo fator de necrose tumoral  $\alpha$  e interleucina 1- $\alpha$ , alterando a composição da ferritina e dificultando seu reconhecimento pelo anticorpo (HARRISON & AROSIO, 1996);

- d) Agentes oxidantes são capazes de promover a geração de radicais livres que podem afetar resíduos de aminoácidos de proteínas, sendo os mais sensíveis: a metionina, histidina, triptofano, lisina, tirosina, prolina e cisteína (STADMAN, 1990);
- e) Alguns xenobióticos como semiquinonas, antraciclina e radicais nitroaromáticos, com potencial de redução menores que o da ferritina, são capazes de retirar ferro de ferritinas (MONTEIRO *et al.*, 1989);
- f) A liberação de ferro de ferritina intracelular, por agentes redutores ou quelantes, pode implicar em oxidação ou degradação da apoproteína através da geração de espécies reativas de oxigênio (MONTEIRO *et al.*, 1989);
- g) Os níveis de ferritina plasmática são alterados em várias doenças para as quais os fármacos nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina são utilizados no tratamento (COHEN *et al.*, 1981; MELO, 1999);
- h) Os informes técnicos dos sistemas comerciais utilizados nas dosagens de ferritina não trazem nenhuma informação sobre possíveis interferências destes fármacos nos resultados dos exames (ABBOTT LABORATORIES, 1998);
- i) Utiliza-se ferritina de baço como padrão para dosagem de ferritina plasmática cuja origem pode ser hepática (TRAN *et al.*, 1997) e cujas propriedades químicas são distintas da de baço (ABBOTT LABORATORIES, 1998);
- j) Alguns dos medicamentos analisados (metronidazol e paracetamol) são conhecidos por promoverem modificações em proteínas, ligando-se aos grupos sulfidril (-SH) resultando em severa depleção destes, que caso ocorressem também na apoferritina poderiam comprometer a interpretação dos resultados dos

- exames por dificultar o reconhecimento pelo anticorpo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999);
- k) Nos casos de hepatomas normalmente se verifica aumento nas concentrações de ferritina plasmática, contudo, pode-se verificar que alguns anticorpos utilizados em sistemas comerciais não são de ferritina hepática (COHEN *et al.* 1981; ABBOTT LABORATORIES, 1998);
  - l) Existem relatos na literatura da existência de diferenças imunológicas entre populações de isoferritinas de vários tecidos utilizando outras metodologias (HAZARD *et al.*, 1977; CRICHTON *et al.*, 1973), porém não foram encontrados estudos utilizando MEIA e ferritinas padrões de sistemas normalmente utilizados na rotina laboratorial;
  - m) Não são feitos de rotina acompanhamentos de modificação de resultados de dosagem de ferritina, apesar de saber-se que cadeias H de ferritina podem ser seletivamente aumentadas pelo tratamento de células de tecido, tumoral ou não, pelo fator de necrose tumoral alfa, interleucina 1-alfa, tireotropina, AMP cíclico e outros fatores (HARRISON & AROSIO, 1996).

### 3. OBJETIVOS

1. Avaliar se a metodologia de enzimaensaio com micropartículas do sistema AXSYM – Abbott Laboratories, apresenta sensibilidade e especificidade adequadas para determinar, quantitativamente, concentrações iguais de ferritinas de diferentes tecidos humanos (baço, fígado e coração), em amostras individuais;
2. Avaliar se esta metodologia apresenta especificidade satisfatória para a dosagem de uma ferritina em soluções contendo uma mistura de ferritinas de tecidos distintos (baço, fígado e coração);
3. Avaliar se a ação de medicamentos específicos (nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina) interferem no sistema de dosagem de ferritina.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Ferritinas comerciais

Ferritina de fígado humano (tipo IV), solução estéril, filtrada, contendo 10 µg/mL, em NaCl 0,15 M e 0,1 % de azida sódica (Sigma – Aldrich, Inc. F6754). Ferritina de baço humano (tipo V), solução estéril, filtrada, contendo 10 µg/mL, em NaCl 0,15 M, 10 mM de tampão tris, pH 8,0 e 0,1 % de azida sódica (Sigma-Aldrich, Inc. F6879). Ferritina de coração humano (tipo VII), solução estéril, filtrada, contendo 10 µg/mL, em NaCl 0,15 M e 0,1% de azida sódica (Sigma-Aldrich, Inc. F4131). Segundo o fabricante o grau de pureza das ferritinas é de 98 %.

### 4.2 REAGENTES

#### 4.2.1 Reagentes que Compõem o Sistema para Dosagem de Ferritina Plasmática (AXSYM – Abbott Laboratories)

Anticorpo monoclonal (camundongo) anti-ferritina, adsorvido em micropartículas, em tampão tris com estabilizadores de proteínas e azida sódica como conservante; anticorpo anti-ferritina (coelho), conjugado com fosfatase alcalina em tampão tris com estabilizadores de proteínas e azida sódica como conservante, concentração mínima 0.1 µg/ml; diluente de amostras, tampão tris contendo agente surfactante, proteínas estabilizadoras e azida sódica como conservante; diluente de reativos, solução de tampão fosfato 0.1M, contendo agente antimicrobiano e azida sódica como conservantes; tampão tris com 0,3 M de cloreto de sódio, contendo azida sódica e agentes antimicrobianos como conservantes; calibradores principais de ferritina, padrões principais contendo ferritina humana (baço), preparada em tampão fosfato com proteínas estabilizadoras e azida sódica como conservante, referenciados

com FERRITINA OMS 80/602 (Padrão internacional), nas concentrações de 0 e 50 ng/mL; calibradores de ferritina, soluções de referência contendo ferritina humana (baço), preparada em tampão fosfato com estabilizadores de proteínas e azida sódica como conservante, referenciados com FERRITINA OMS 80/602 (Padrão internacional), nas concentrações de 0, 10, 50, 250, 500 e 1000 ng/mL; controles de ferritina, soluções contendo ferritina humana (baço), preparada em tampão fosfato com estabilizadores de proteínas e azida sódica como conservante, nas concentrações e faixas de utilização de 20 (16-24), 150 (120-180) e 400 (320-480) ng/mL; substrato, solução de fosfato de 4-metilumbelliferil, 1,2 mM, em tampão AMP e azida sódica como conservante; solução de lavagem da “célula matriz”, cloreto de sódio 0,3M em tampão tris, contendo agente antimicrobiano e azida sódica como conservantes, solução de lavagem das sondas de amostra do equipamento, solução a 2 % de hidróxido de tetrametilamônio.

#### 4.2.2 Soro Controle

Soro controle liofilizado BIO-RAD nível 2 lote 40092, na concentração de 187,0 (149-224) ng/mL de ferritina plasmática.

#### 4.2.3 Fármacos

Metronidazol – grau de pureza 99,3 % (Parke Davis), paracetamol – grau de pureza 100 % (Sigma Aldrich), nitrofurantoína – grau de pureza 99,1 % (Farmitalia Carlo Erba), aciclovir – grau de pureza 99,0 % (Parke Davis) e ciprofloxacina – grau de pureza 99,7 % (Sigma Aldrich).

### 4.3 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FERRITINAS

Foram preparadas soluções de ferritinas, individuais e em misturas, utilizando-se como diluente de amostras o tampão tris, fornecido pelo sistema comercial,

contendo agente surfactante, estabilizadores de proteínas e azida sódica como conservante. As ferritinas individuais de fígado, baço e coração foram preparadas nas concentrações de 20, 150, 400 e 600 ng/mL, bem como as soluções contendo ferritinas de fígado/baço, fígado/coração e baço/coração, na proporção de 1:1, também preparadas em concentrações finais de 20, 150, 400 e 600 ng/mL. Utilizamos, ainda, soluções contendo ferritinas de baço/fígado/coração na proporção de 1:1:1, nas mesmas concentrações anteriormente descritas, conforme tabelas a seguir:

**TABELA 1 – FERRITINAS INDIVIDUAIS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

<b>Concentrações das ferritinas individuais</b>			
20 ng/mL	150 ng/mL	400 ng/mL	600 ng/mL
Fígado	Fígado	Fígado	Fígado
Coração	Coração	Coração	Coração
Baço	Baço	Baço	Baço

**TABELA 2 - MISTURAS DE FERRITINAS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES (1:1) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

<b>Concentrações finais das soluções de ferritinas nas misturas. Solução (1:1)</b>			
20 ng/mL	150 ng/mL	400 ng/mL	600 ng/mL
Fígado/Coração	Fígado/Coração	Fígado/Coração	Fígado/Coração
Fígado/Baço	Fígado/Baço	Fígado/Baço	Fígado/Baço
Baço/Coração	Baço/Coração	Baço/Coração	Baço/Coração

**TABELA 3 - MISTURAS DE FERRITINAS DE TECIDOS HUMANOS EM SOLUÇÕES (1:1:1) COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES**

<b>Concentrações finais das soluções de ferritinas nas misturas. Solução (1:1:1)</b>			
20 ng/mL	150 ng/mL	400 ng/mL	600 ng/mL
Fígado/Baço/ /Coração	Fígado/Baço/ /Coração	Fígado/Baço/ /Coração	Fígado/Baço/ /Coração

#### 4.4 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FÁRMACOS

Foram preparadas soluções aquosas de metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina. As soluções de nitrofurantoína foram preparadas utilizando-se como solvente a dimetilformamida (DMF). As concentrações das soluções foram as seguintes: a) 205,2, 136,8, 68,4, 34,1 e 17,0 µg/100 µL para o metronidazol; b) 181,2, 120,8, 60,4, 30,2 e 15,1 µg/100 µL para o paracetamol; c) 296,4, 197,6, 98,8, 49,4 e 24,7 µg/100 µL para o aciclovir; d) 463,2, 77,2, 38,6, 23,2, 7,7 e 3,9 µg/100 µL para a ciprofloxacina; e) 285,6, 190,4, 95,2, 47,6 e 23,8 µg/100 µL para a nitrofurantoína.

#### 4.5 TRATAMENTO DE SORO CONTROLE CONTENDO FERRITINA COM SOLUÇÕES DE FÁRMACOS

O soro controle liofilizado, contendo ferritina plasmática na concentração de 187,0 (149-224) ng/mL, foi reconstituído em volume de água deionizada e homogeneizado conforme condições indicadas pelo protocolo do fabricante. Em preparações contendo alíquotas de 1900 µL do soro controle foram adicionados, separadamente, 100 µL das soluções dos fármacos (metronidazol, paracetamol, aciclovir, ciprofloxacina e nitrofurantoína) nas concentrações indicadas no item anterior. As soluções resultantes, com volume final de 2000 µL, contém metronidazol, paracetamol, aciclovir, e nitrofurantoína em concentrações molares de 50, 100, 200, 400 e 600 µmol/L. As soluções de ciprofloxacina resultaram em concentrações molares de 5, 10, 30, 50 e 100 µmol/L. Para a ciprofloxacina foi preparado uma solução adicional na concentração de 600 µmol/L, misturada em igual volume com o soro controle na proporção de 1:1, com volume final de 2000 µL.

#### 4.6 DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DE FERRITINAS

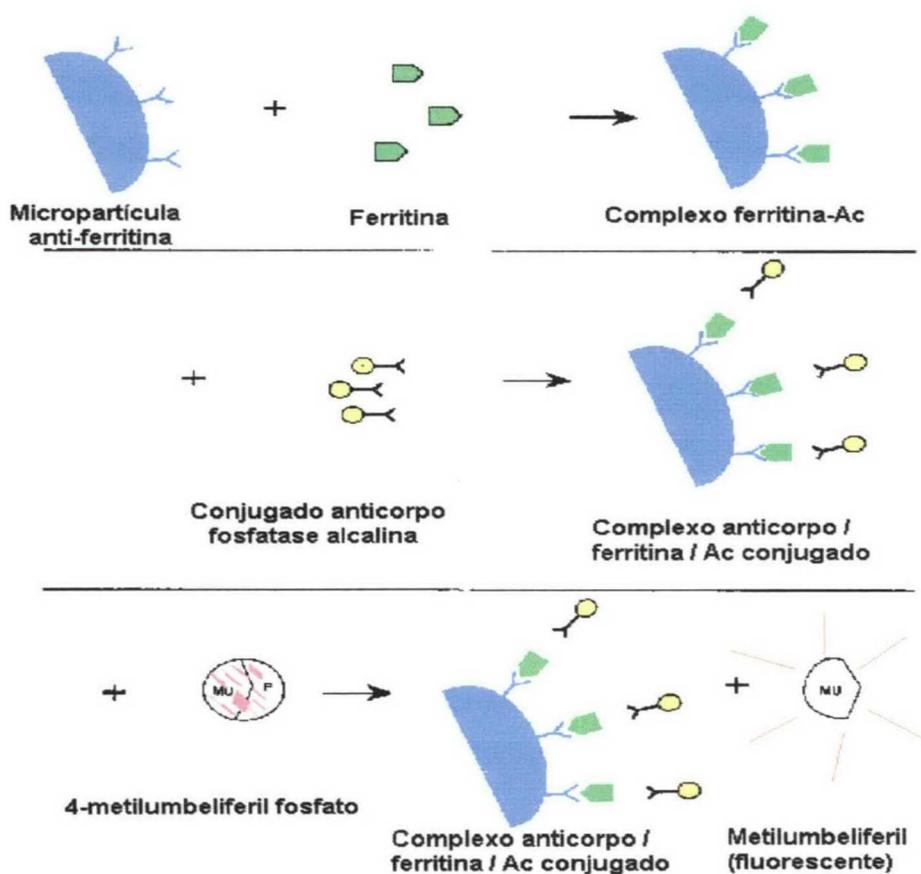
A figura 4 mostra o esquema da metodologia utilizada pelo sistema em estudo e recomendada pelo fabricante que apresenta a seqüência de procedimentos técnicos, realizados automaticamente, conforme descrito a seguir. No centro de amostras a amostra e todos os reagentes que compõe o sistema, descritos anteriormente, necessários para uma determinação são pipetados pela sonda de amostras para as cubetas de amostras e reagentes da bandeja de reações. A amostra é pipetada para uma cubeta de reação, o anticorpo anti-ferritina (monoclonal de camundongo) aderido em micropartículas, o conjugado fosfatase alcalina/anticorpo anti-ferritina (monoclonal de coelho), diluente de amostras e o tampão tris são pipetados em outra cubeta de reação. A bandeja de reações é transferida para o centro de processamento onde uma alíquota da solução do diluente de amostras, anticorpo conjugado, anticorpo em micropartículas e tampão tris é pipetada e misturada com a amostra na cubeta de reação. Neste estágio, a ferritina, sistema enzimático /anticorpo e micropartículas/anticorpo formam um complexo estável. Uma alíquota da mistura de reação contendo o complexo anticorpo – antígeno – anticorpo aderido às micropartículas é transferido para a “célula matriz”. As micropartículas aderem-se irreversivelmente às fibras de vidro da matriz que é lavada para a remoção de materiais não aderidos. O substrato para o sistema enzimático, fosfato de 4-metilumbeliferil, é adicionado à “célula matriz”, o produto resultante é medido pelo sistema ótico (figura 5) e o resultado convertido em ng/ml de ferritina.

Segundo o fabricante a sensibilidade do método detecta concentrações de ferritina de 1,0 ng/mL, e amostras com concentrações superiores a 1000 ng/mL devem ser previamente diluídas. Dependendo da concentração, o coeficiente de variação é de 4,09 a 6,59 %. O método apresenta interferência, segundo o protocolo do fabricante, na presença de níveis séricos de bilirrubina acima de 17 mg/dL, hemoglobina acima de 1000 mg/dL, triglicérides acima de 850 mg/dL e colesterol acima de 456 mg/dL, quando os resultados de ferritina fornecidos apresentam uma diferença para menor de 10%. Não há referência quanto a interferência de medicamentos.

Utilizando a metodologia do sistema comercial, baseado em ensaios imunoenzimáticos com micropartículas, foram realizadas dosagens de ferritina nas soluções contendo ferritinas individuais de baço, fígado e coração, como também nas soluções contendo misturas das ferritinas. As soluções contendo ferritina plasmática tratadas com fármacos, assim como os soros contendo ferritina utilizados como controles e brancos, preparados em água e em dimetilformamida, sem a adição de fármacos, foram incubados por 72 horas em banho-maria 37° C. Destas preparações foram retiradas alíquotas para dosagens de ferritina nas soluções testes, controles e brancos após incubação de 1, 4, 8, 24, 48, e 72 horas. Para a ciprofloxacina na concentração de 600 µmol/L foi retirada uma alíquota com 72 horas.

O soro contendo ferritina plasmática, na concentração de 187,0 ng/mL (149,0-224,0 ng/mL), foi utilizado como controle em todas as tomadas de alíquotas para dosagens, observando-se as diluições correspondentes. As dosagens foram feitas pelo sistema automatizado *AxSYM system – Abbott Laboratories*, e os parâmetros de calibração e controle do equipamento apresentaram-se em conformidade com o preconizado pelo fabricante.

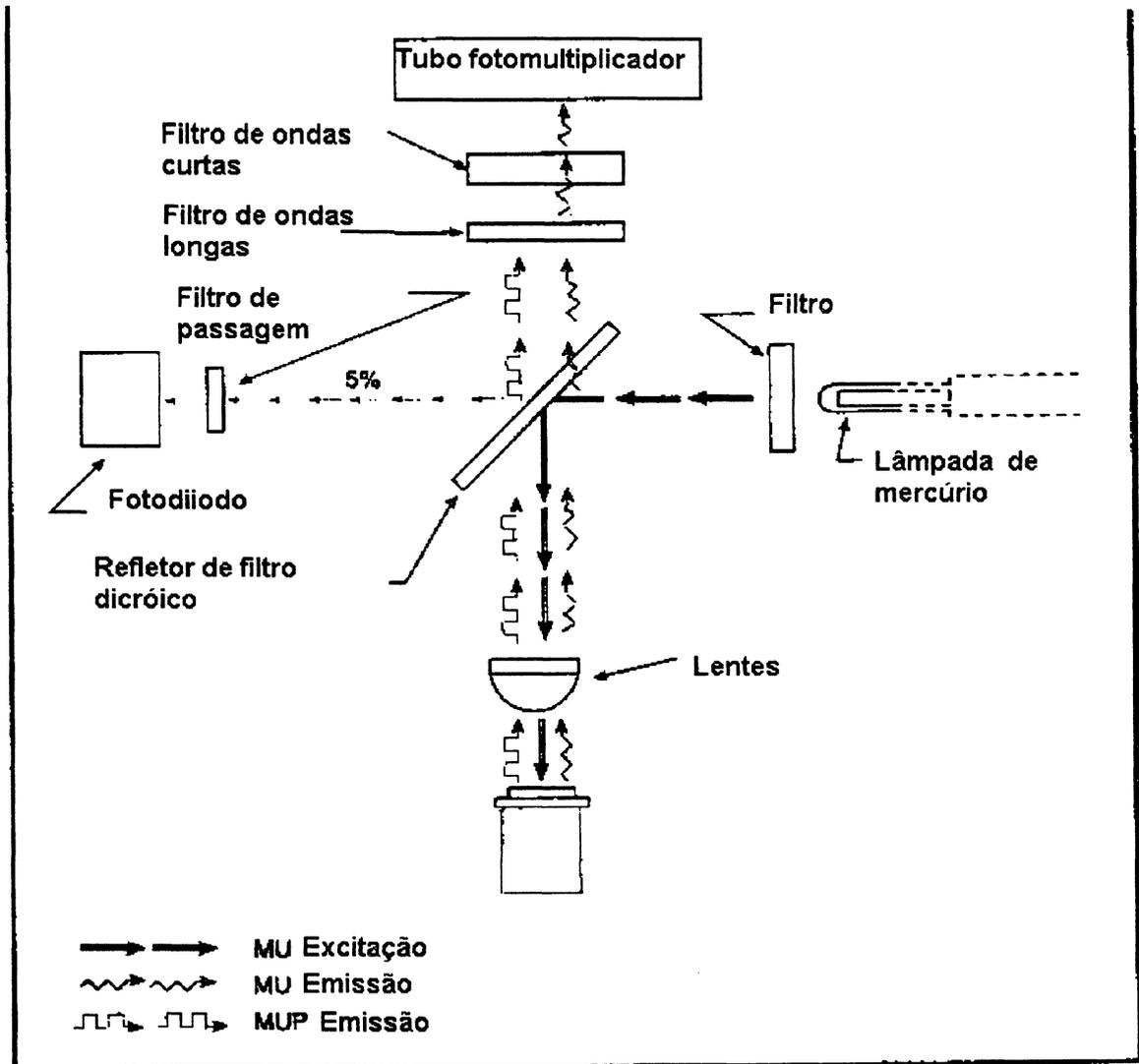
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA SEQUÊNCIA DE REAÇÕES IMUNOENZIMÁTICAS



Representação esquemática da sequência de reações imunoenzimáticas com micropartículas para a dosagem de ferritina pelo sistema AxSYM – Abbott Laboratories.

FONTE: AXSYM SYSTEM – ABBOTT LABORATORIES – MANUAL DO USUÁRIO Nº 3

FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO SISTEMA ÓTICO UTILIZADO NA METODOLOGIA



O sistema óptico do equipamento mede a intensidade de fluorescência produzida pela superfície da célula matriz. O sistema (fluorímetro) utiliza como fonte de luz uma lâmpada de mercúrio.  
 FONTE: AXSYM SYSTEM – ABBOTT LABORATORIES – MANUAL DO USUÁRIO Nº 3

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se as funções de estatística do Microsoft Excel, versão 2000. As medidas de tendência central foram analisadas utilizando-se a média de triplicatas dos valores obtidos com cinco experimentos independentes ( $n = 15$ ), para a análise das medidas de dispersão utilizou-se desvio padrão e coeficiente de variação, e para os testes de hipóteses utilizou-se o teste-t de Student com significância para valores de  $p$  menores que 0,05 (LAPPONI, 2000).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 DOSAGENS DE FERRITINAS TECIDUAIS

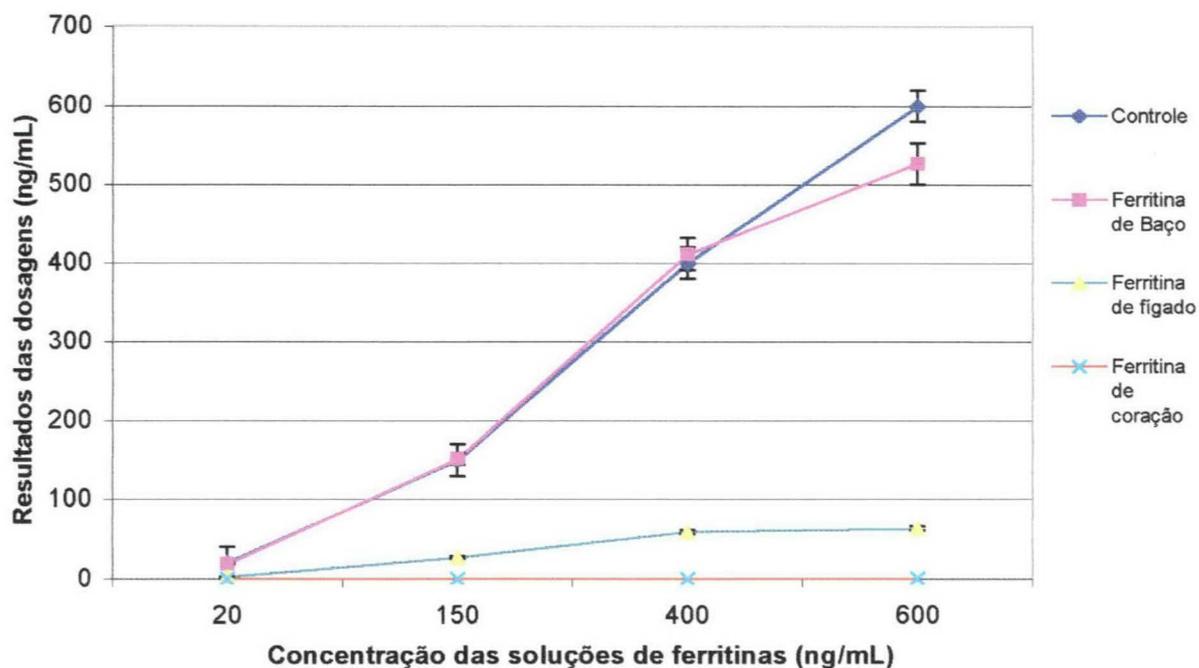
Os resultados com a dosagem de ferritinas individuais utilizando-se ferritinas humanas de coração, fígado e baço são apresentados na tabela 4 e na figura 6. Para as misturas de ferritinas os resultados podem ser observados nas tabelas 5 e 6 e nas figuras 7 e 8.

TABELA 4 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS DE ÓRGÃOS DIFERENTES POR MEIA

Ferritina	Concentração utilizada (ng/mL)	Valores obtidos (ng/mL)	% do total adicionado
Fígado	20,0	1,9 ± 0,4	9,5
	150,0	26,7 ± 0,8	17,8
	400,0	59,1 ± 0,5	14,7
	600,0	63,5 ± 3,7	10,6
Coração	20,0	0,0 ± 0,0	0,0
	150,0	0,0 ± 0,0	0,0
	400,0	0,0 ± 0,0	0,0
	600,0	0,4 ± 0,1	0,1
Baço	20,0	18,6 ± 0,5	93,0
	150,0	151,3 ± 1,9	100,8
	400,0	402,8 ± 13,9	100,7
	600,0	576,5 ± 31,7	96,1

Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 6 - DOSAGENS DE FERRITINAS DE DIFERENTES TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS



Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 5 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS POR MEIA, EM SOLUÇÕES CONTENDO DOIS TIPOS DE FERRITINAS

Ferritinas	Concentração final utilizada (ng/mL)	Valores obtidos (ng/mL)	% do total adicionado
fígado / coração (sol. 1:1)	20,0	0,4 ± 0,1	2,0
	150,0	13,7 ± 0,9	9,1
	400,0	29,5 ± 2,0	7,4
	600,0	29,7 ± 1,7	5,0
baço / coração (sol. 1:1)	20,0	8,4 ± 0,5	42,0
	150,0	78,7 ± 4,3	52,5
	400,0	186,7 ± 11,4	46,7
	600,0	228,1 ± 13,2	38,0
baço / fígado (sol. 1:1)	20,0	9,9 ± 0,7	49,5
	150,0	90,5 ± 5,8	60,3
	400,0	219,5 ± 15,1	54,9
	600,0	245,4 ± 18,2	40,9

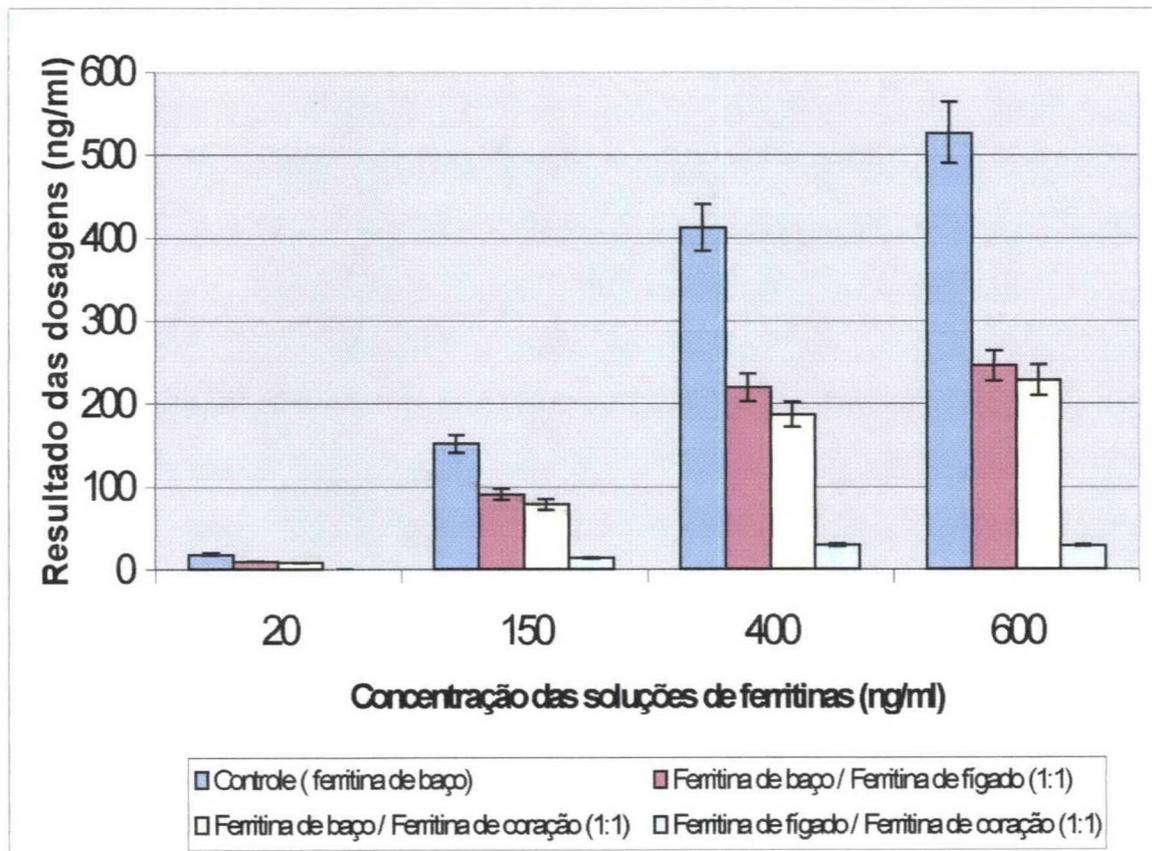
Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 6 - DOSAGEM DE FERRITINAS HUMANAS POR MEIA, EM SOLUÇÕES CONTENDO TRÊS TIPOS DE FERRITINAS

Ferritinas	Concentração final utilizada (ng/mL)	Valores obtidos (ng/mL)	% do total adicionado
fígado/coração/ baço (sol. 1:1:1)	20,0	6,1 ± 0,4	30,5
	150,0	53,2 ± 3,3	35,5
	400,0	139,3 ± 9,5	34,8
	600,0	169,1 ± 11,2	28,2

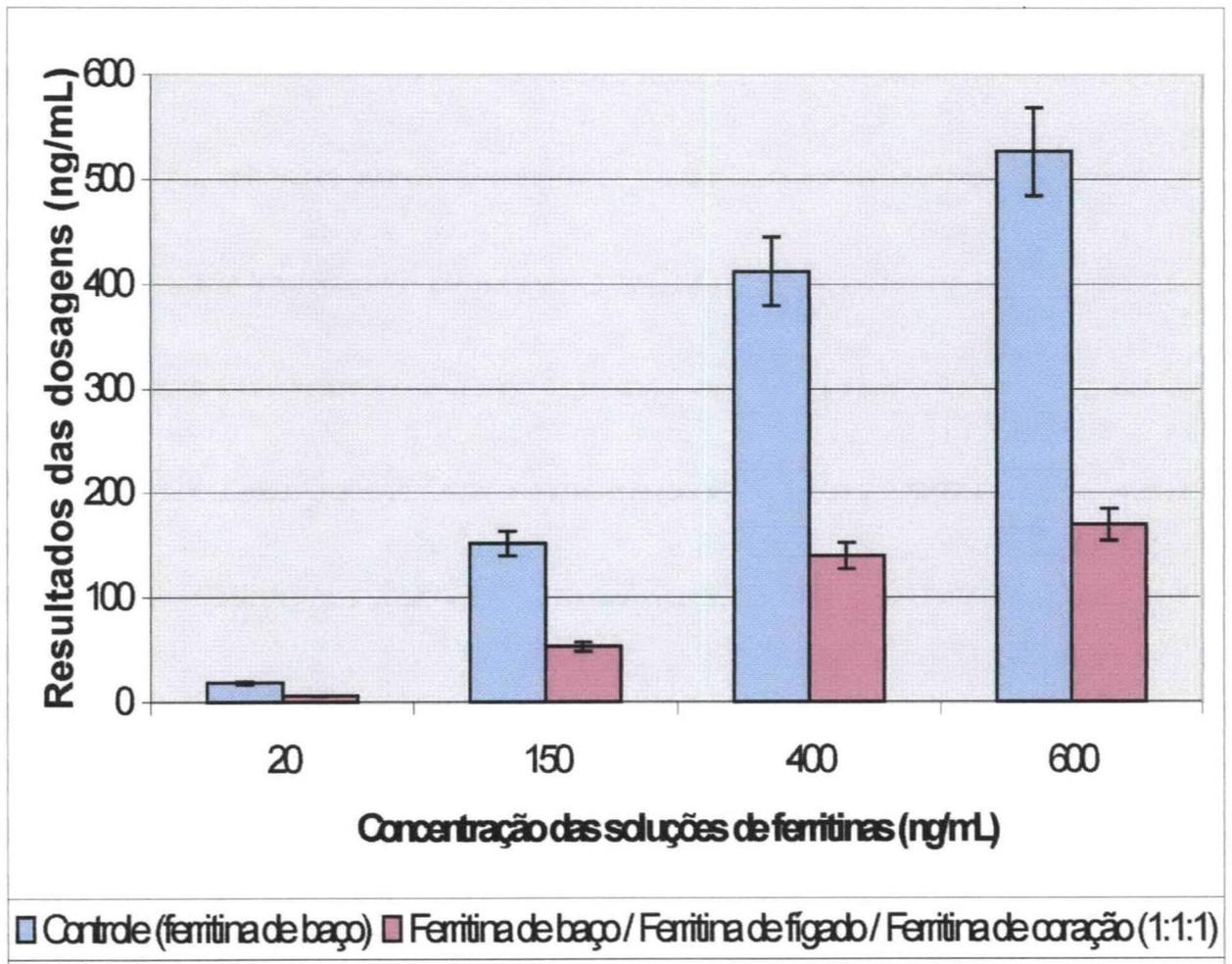
Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 7 - DOSAGENS DE SOLUÇÕES CONTENDO COMBINAÇÕES DE FERRITINAS DE DOIS DIFERENTES TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS.



Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 8 - DOSAGENS DE SOLUÇÕES CONTENDO COMBINAÇÕES DE FERRITINAS DE TRÊS DIFERENTES TIPOS DE TECIDOS EM CONCENTRAÇÕES VARIÁVEIS



Sistema: Os volumes de ferritinas teciduais correspondentes às concentrações indicadas acima, diluídos em diluente de amostras do sistema comercial, foram submetidos às reações de enzima-imunoenensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 5.2 EFEITOS DE FÁRMACOS SOBRE A FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

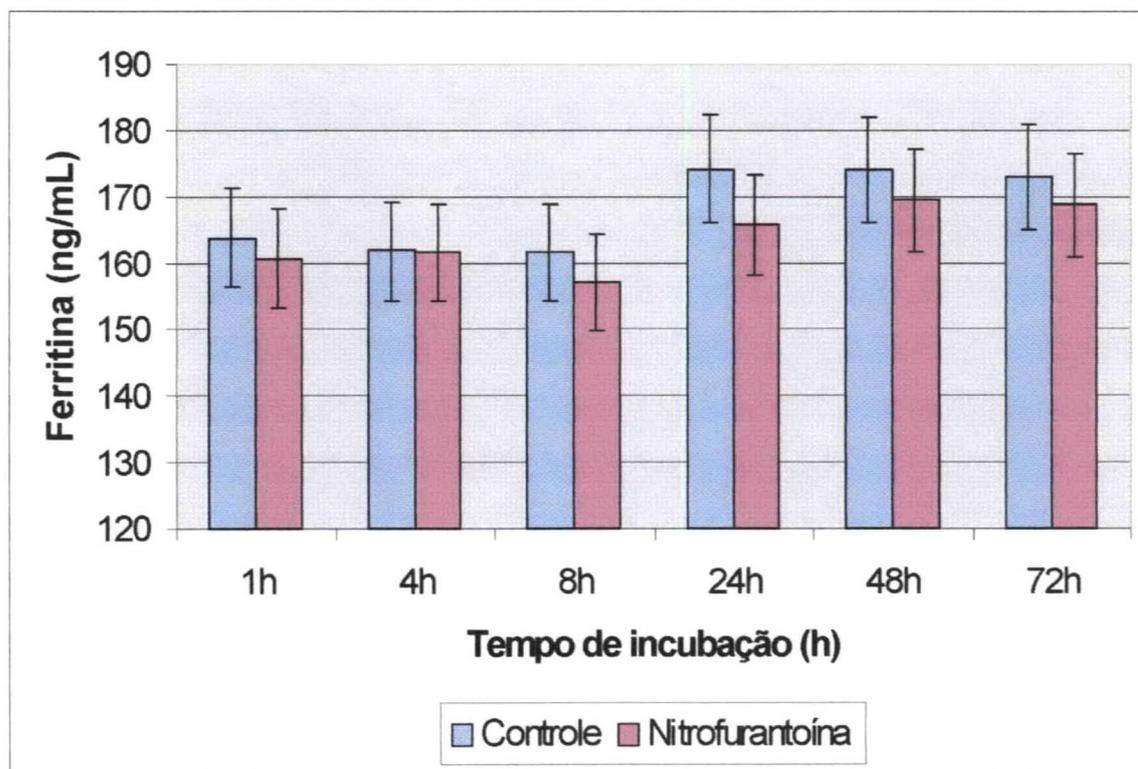
Os resultados dos experimentos realizados com o objetivo de identificar possível interferência de alguns fármacos (nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina), que apresentam efeito sobre a estrutura da proteína, na metodologia de dosagem da ferritina plasmática são apresentados nas tabelas 7 a 12 e nas figuras 9 a 20.

TABELA 7 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Nitrofurantoína ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)
	1h	4 h	8 h	24h	48h	72h
0	163,8 $\pm$ 8,9	161,9 $\pm$ 9,6	161,6 $\pm$ 8,2	174,2 $\pm$ 7,2	174,1 $\pm$ 6,6	172,9 $\pm$ 9,3
50	160,7 $\pm$ 9,5	161,6 $\pm$ 8,3	157,2 $\pm$ 9,2	165,8 $\pm$ 8,4	169,4 $\pm$ 8,1	168,8 $\pm$ 9,0
100	160,1 $\pm$ 7,6	160,8 $\pm$ 8,7	156,7 $\pm$ 9,8	163,2 $\pm$ 8,1	161,7 $\pm$ 8,9	168,1 $\pm$ 8,4
200	158,2 $\pm$ 8,4	160,3 $\pm$ 7,8	157,8 $\pm$ 8,5	160,9 $\pm$ 8,2	161,2 $\pm$ 7,7	165,1 $\pm$ 9,7
400	158,4 $\pm$ 8,1	161,3 $\pm$ 8,4	158,8 $\pm$ 8,9	161,4 $\pm$ 9,0	162,2 $\pm$ 8,2	164,4 $\pm$ 9,5
600	166,9 $\pm$ 7,8	162,6 $\pm$ 6,9	155,9 $\pm$ 8,6	177,6 $\pm$ 7,8	171,8 $\pm$ 7,6	175,2 $\pm$ 8,2

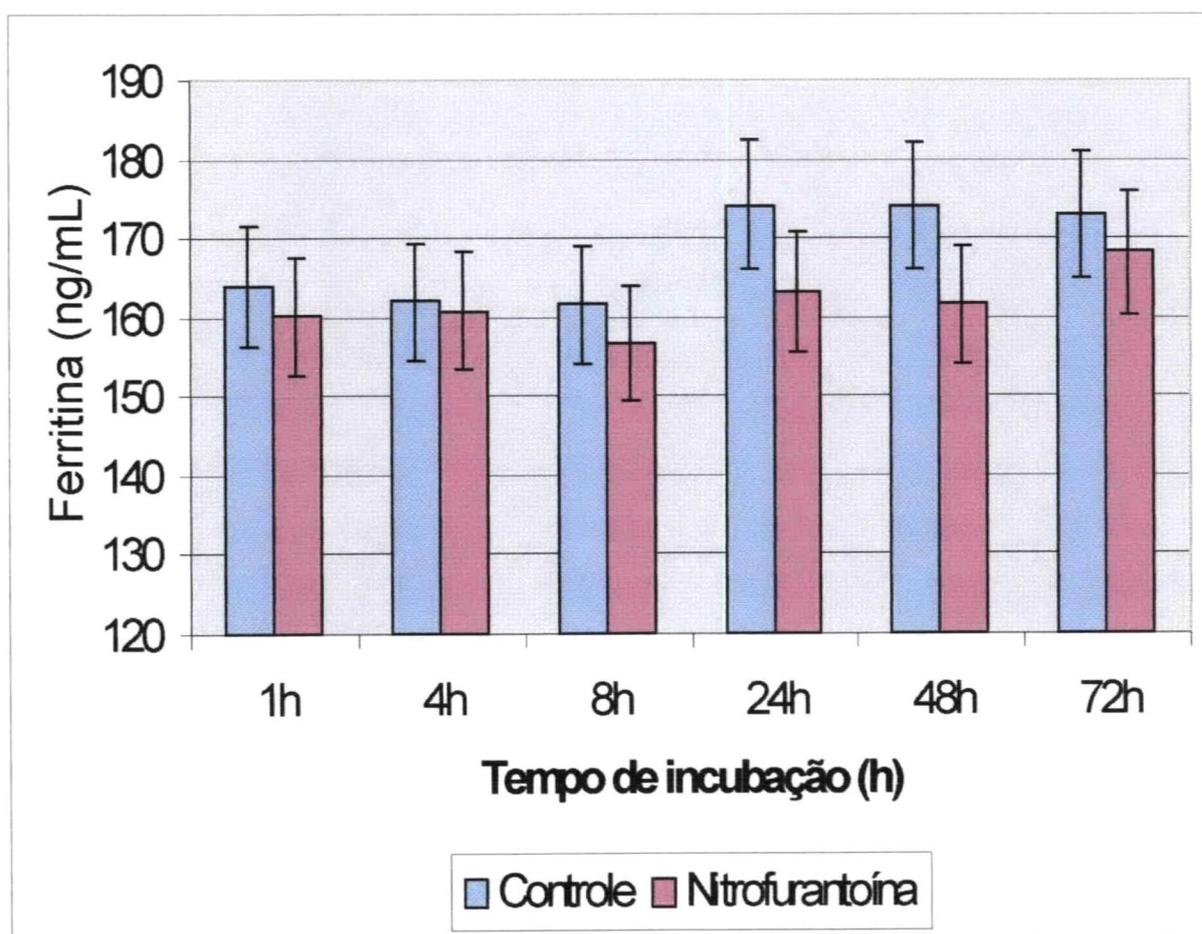
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática (187,0  $\pm$  38,0 ng/mL) contendo nitrofurantoína nas concentrações e tempos de incubação a 37 °C, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 9 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (50  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



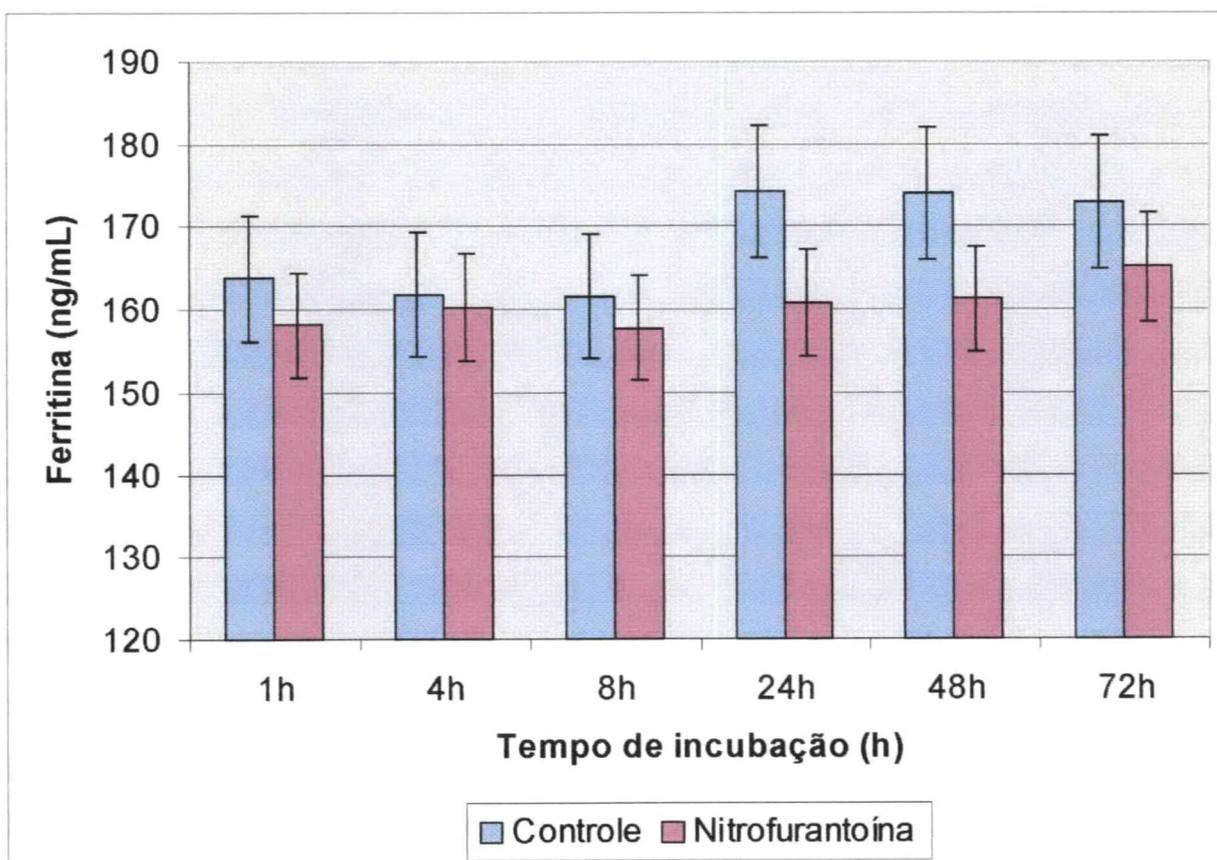
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo nitrofurantoína na concentração de  $50 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 10 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (100  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.



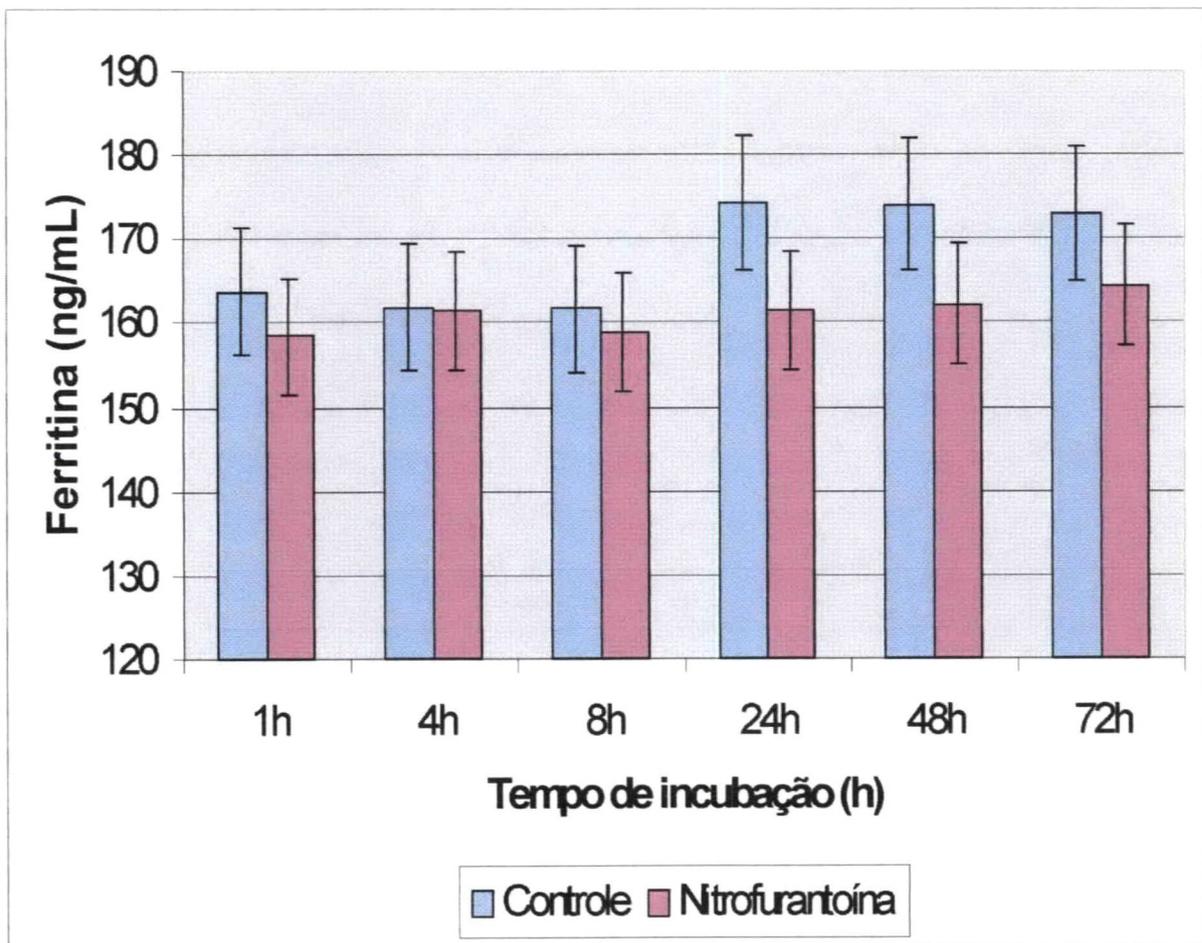
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo nitrofurantoína na concentração de  $100 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 11 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (200  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.



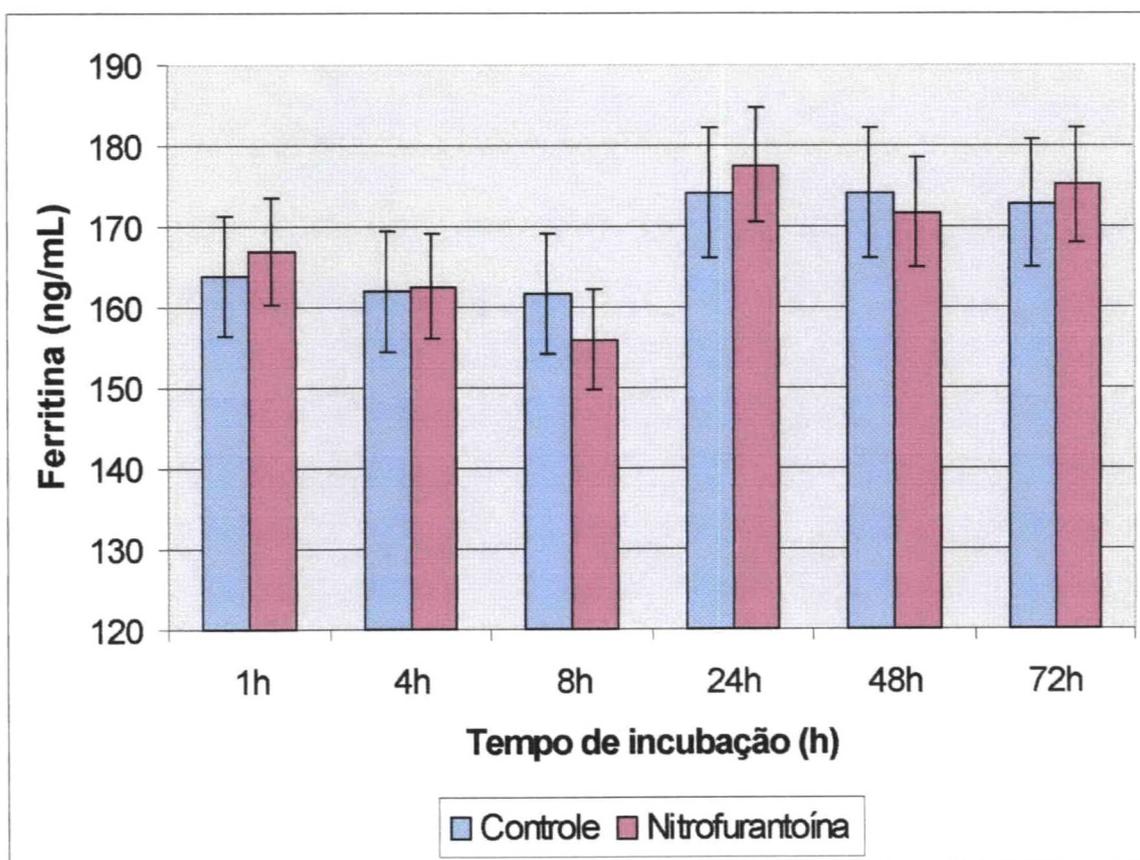
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo nitrofurantoína na concentração de  $200 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), descritos no ítem 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 12 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (400  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.



Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo nitrofurantoína na concentração de  $400 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 13 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM NITROFURANTOÍNA (600  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA.



Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo nitrofurantoína na concentração de  $600 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no ítem 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 8 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM METRONIDAZOL SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Metronidazol ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)
	1 h	4 h	8 h	24h	48h	72h
<b>0</b>	162,4 $\pm$ 6,4	161,6 $\pm$ 6,4	161,5 $\pm$ 8,1	162,3 $\pm$ 5,3	166,1 $\pm$ 7,3	162,5 $\pm$ 7,2
<b>50</b>	159,7 $\pm$ 7,9	153,2 $\pm$ 6,3	150,5 $\pm$ 6,3	154,8 $\pm$ 7,6	161,2 $\pm$ 6,8	160,4 $\pm$ 6,1
<b>100</b>	159,8 $\pm$ 7,6	158,7 $\pm$ 9,1	154,4 $\pm$ 7,1	160,1 $\pm$ 7,1	160,2 $\pm$ 7,0	162,3 $\pm$ 5,7
<b>200</b>	151,3 $\pm$ 6,1	158,1 $\pm$ 9,2	166,1 $\pm$ 9,8	162,5 $\pm$ 7,7	160,4 $\pm$ 7,4	158,9 $\pm$ 7,5
<b>400</b>	153,3 $\pm$ 6,5	165,3 $\pm$ 9,6	153,9 $\pm$ 8,3	158,9 $\pm$ 7,0	161,2 $\pm$ 6,6	160,8 $\pm$ 5,1
<b>600</b>	155,4 $\pm$ 6,8	161,2 $\pm$ 6,7	162,2 $\pm$ 6,5	153,6 $\pm$ 6,1	152,0 $\pm$ 6,2	160,5 $\pm$ 4,7

Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol nas concentrações e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 9 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM PARACETAMOL SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Paracetamol ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)	Ferritina (ng/mL)
	1 h	4 h	8 h	24h	48h	72h
<b>0</b>	162,4 $\pm$ 6,4	161,6 $\pm$ 6,4	161,5 $\pm$ 9,1	162,3 $\pm$ 5,3	166,1 $\pm$ 7,3	162,5 $\pm$ 7,2
<b>50</b>	154,8 $\pm$ 5,2	161,4 $\pm$ 6,5	156,9 $\pm$ 9,2	157,8 $\pm$ 7,2	159,8 $\pm$ 6,4	162,3 $\pm$ 6,8
<b>100</b>	150,1 $\pm$ 4,3	167,7 $\pm$ 7,5	159,9 $\pm$ 7,1	162,3 $\pm$ 7,8	160,5 $\pm$ 7,2	159,2 $\pm$ 5,9
<b>200</b>	155,6 $\pm$ 6,8	165,6 $\pm$ 9,6	157,4 $\pm$ 6,0	158,8 $\pm$ 6,5	160,2 $\pm$ 7,4	159,7 $\pm$ 7,2
<b>400</b>	155,9 $\pm$ 5,1	155,4 $\pm$ 8,1	159,7 $\pm$ 6,6	160,1 $\pm$ 6,7	161,2 $\pm$ 6,5	158,4 $\pm$ 6,3
<b>600</b>	153,6 $\pm$ 6,2	153,7 $\pm$ 8,2	151,5 $\pm$ 8,4	149,7 $\pm$ 6,6	157,2 $\pm$ 7,3	161,1 $\pm$ 5,0

Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo paracetamol nas concentrações e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 10 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM ACICLOVIR SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Aciclovir ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL) 1 h	Ferritina (ng/mL) 4 h	Ferritina (ng/mL) 8 h	Ferritina (ng/mL) 24h	Ferritina (ng/mL) 48h	Ferritina (ng/mL) 72h
0	162,4 $\pm$ 6,7	161,6 $\pm$ 6,8	161,5 $\pm$ 7,1	162,3 $\pm$ 6,0	166,1 $\pm$ 7,3	162,5 $\pm$ 6,2
50	161,1 $\pm$ 6,1	160,2 $\pm$ 7,1	155,3 $\pm$ 6,8	158,4 $\pm$ 6,8	160,4 $\pm$ 6,9	164,8 $\pm$ 5,7
100	161,4 $\pm$ 5,2	159,4 $\pm$ 6,9	158,2 $\pm$ 6,0	162,1 $\pm$ 6,4	162,3 $\pm$ 5,8	162,8 $\pm$ 6,0
200	158,1 $\pm$ 6,6	160,8 $\pm$ 7,0	161,2 $\pm$ 4,9	159,7 $\pm$ 6,0	165,2 $\pm$ 6,4	160,9 $\pm$ 6,9
400	159,2 $\pm$ 5,7	159,8 $\pm$ 5,4	160,3 $\pm$ 5,6	161,1 $\pm$ 5,7	164,8 $\pm$ 7,0	154,1 $\pm$ 7,2
600	158,3 $\pm$ 5,4	162,4 $\pm$ 5,1	159,4 $\pm$ 6,0	159,3 $\pm$ 6,3	165,5 $\pm$ 7,6	166,9 $\pm$ 5,4

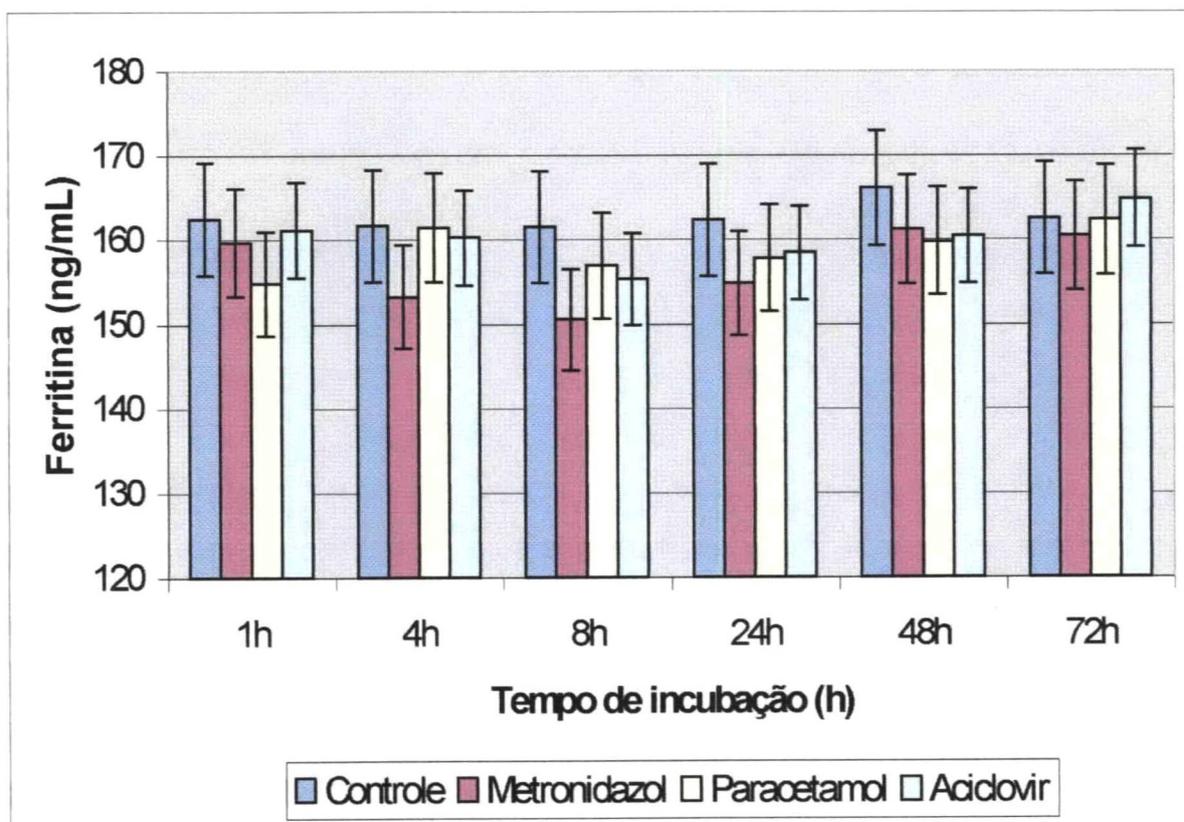
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática (187,0  $\pm$  38,0 ng/mL) contendo aciclovir nas concentrações e tempos de incubação a 37 °C, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 11 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Ciprofloxacina ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL) 1 h	Ferritina (ng/mL) 4 h	Ferritina (ng/mL) 8 h	Ferritina (ng/mL) 24h	Ferritina (ng/mL) 48h	Ferritina (ng/mL) 72h
0	177,8 $\pm$ 4,1	176,9 $\pm$ 6,3	177,9 $\pm$ 6,0	182,8 $\pm$ 6,9	175,5 $\pm$ 5,3	174,1 $\pm$ 6,2
5	175,9 $\pm$ 4,7	172,8 $\pm$ 5,1	178,4 $\pm$ 6,6	181,5 $\pm$ 6,6	178,6 $\pm$ 6,0	178,3 $\pm$ 6,9
10	174,6 $\pm$ 5,2	173,7 $\pm$ 4,8	173,5 $\pm$ 7,2	180,4 $\pm$ 5,8	181,6 $\pm$ 5,9	180,4 $\pm$ 6,4
30	176,7 $\pm$ 4,6	172,2 $\pm$ 6,1	172,9 $\pm$ 5,7	178,5 $\pm$ 6,3	177,1 $\pm$ 6,2	176,9 $\pm$ 5,3
50	177,5 $\pm$ 6,0	174,4 $\pm$ 5,4	173,8 $\pm$ 6,3	177,9 $\pm$ 5,1	178,6 $\pm$ 5,4	181,0 $\pm$ 6,8
100	172,8 $\pm$ 5,2	171,7 $\pm$ 6,7	175,2 $\pm$ 5,9	181,8 $\pm$ 5,7	175,2 $\pm$ 6,2	179,5 $\pm$ 5,5

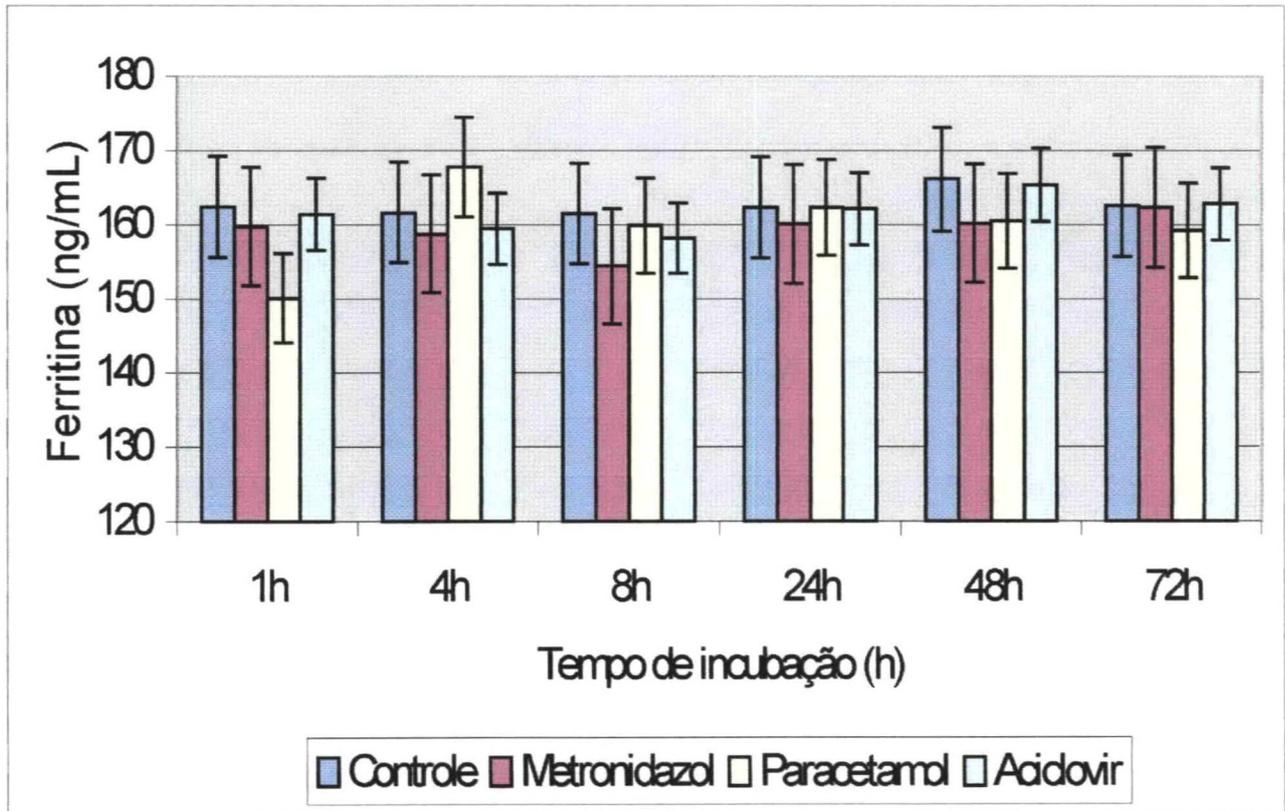
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática (187,0  $\pm$  38,0 ng/mL) contendo ciprofloxacina nas concentrações e tempos de incubação a 37 °C, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 14 - EFEITOS DE FÁRMACOS (50  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



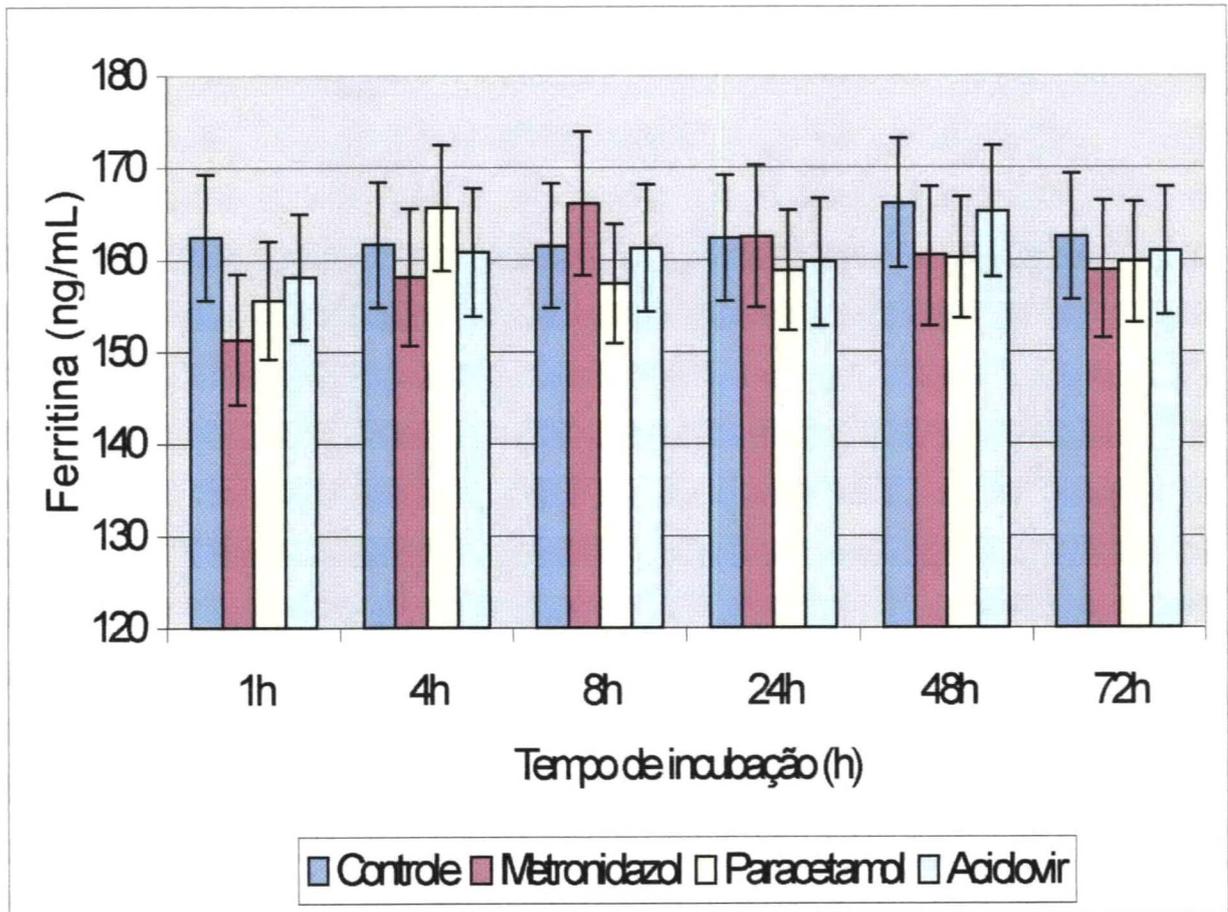
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol, paracetamol e aciclovir na concentração de  $50 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímmunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no ítem 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 15 - EFEITOS DE FÁRMACOS (100  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



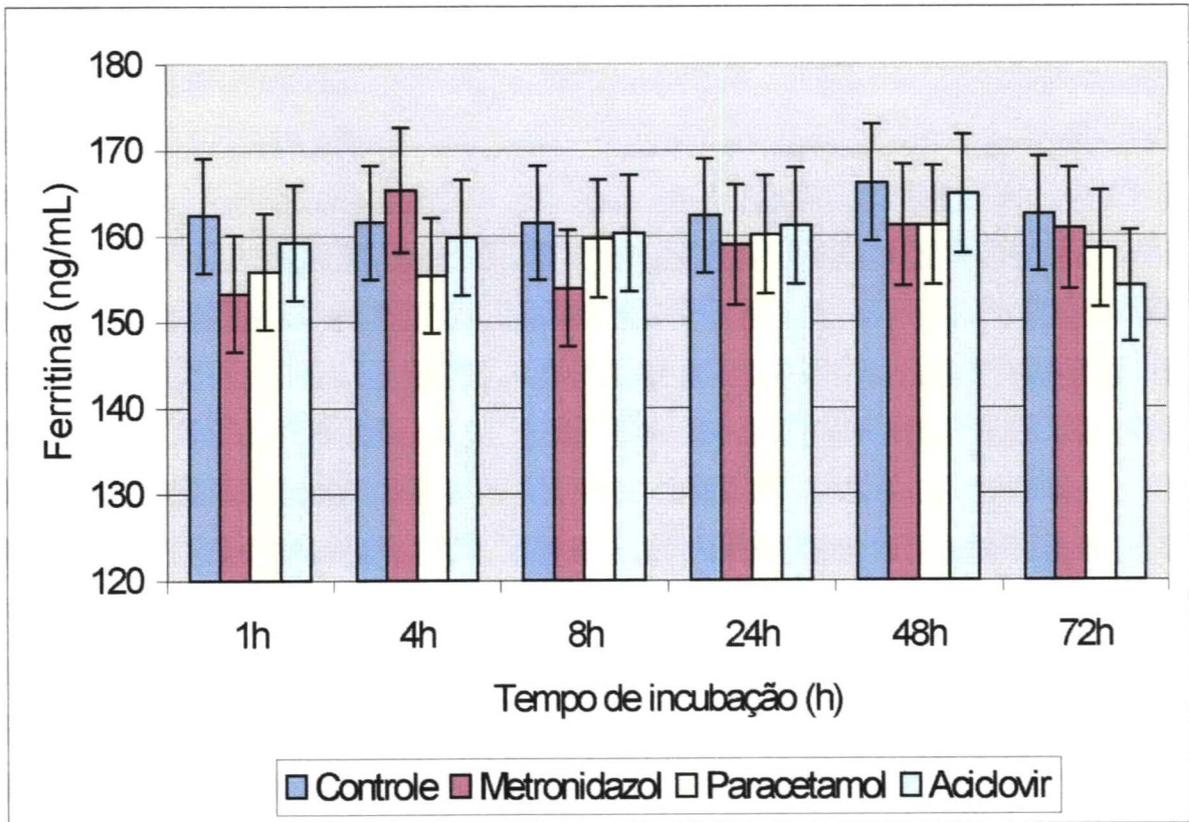
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol, paracetamol e aciclovir na concentração de  $100 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 16 - EFEITOS DE FÁRMACOS (200  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



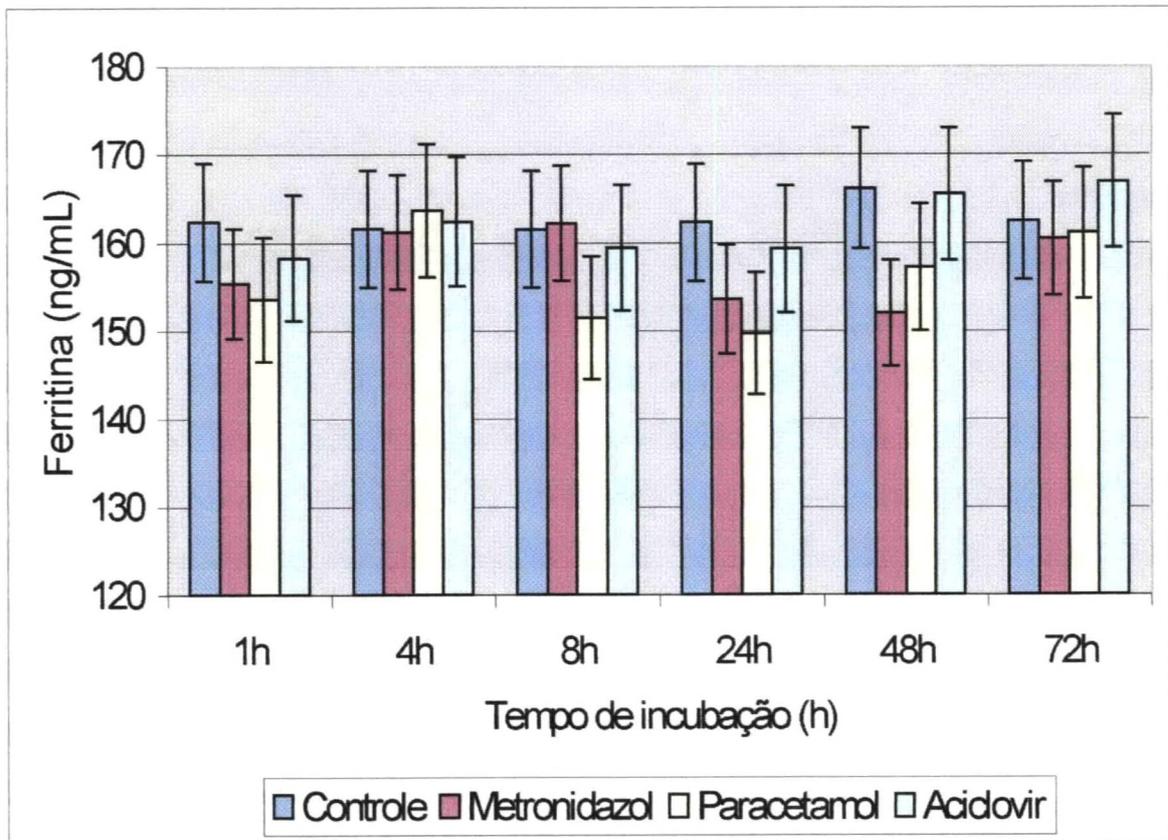
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol, paracetamol e aciclovir na concentração de  $200 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 17 - EFEITOS DE FÁRMACOS (400  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



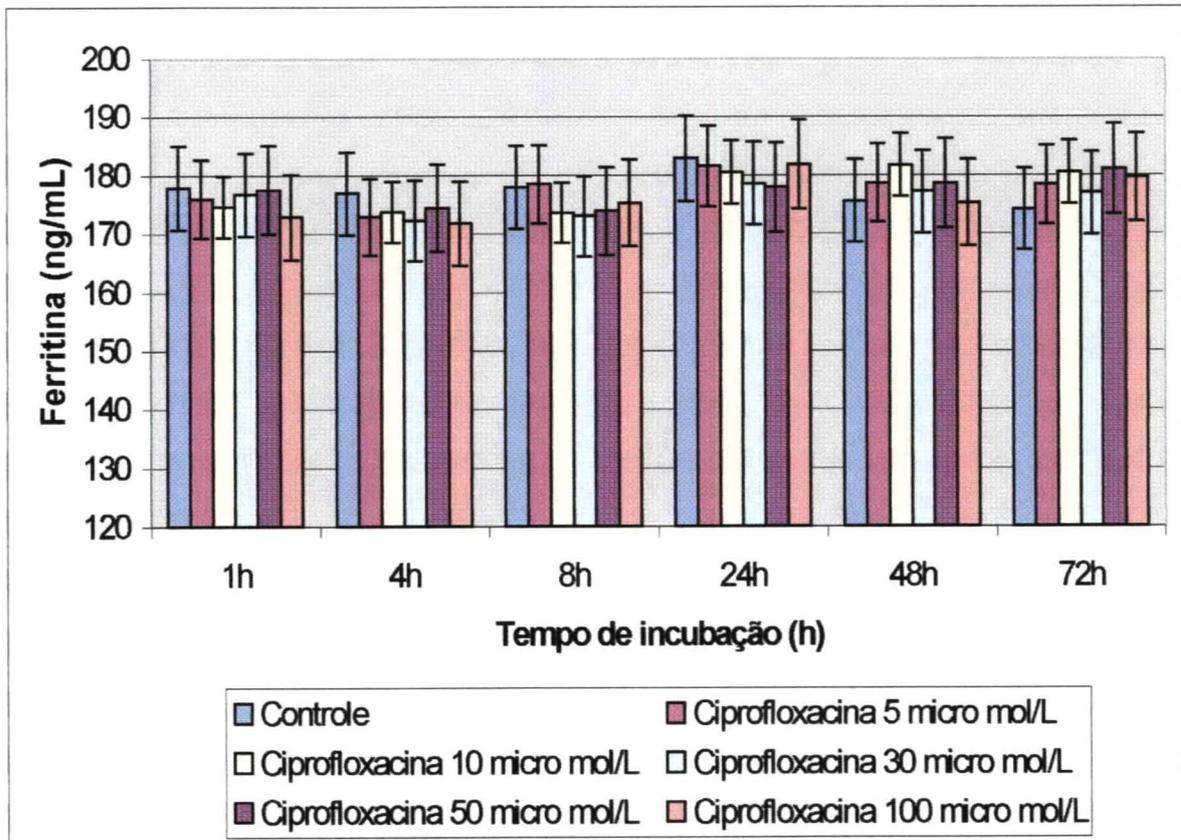
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol, paracetamol e aciclovir na concentração de  $400 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímmunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 18 - EFEITOS DE FÁRMACOS (600  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo metronidazol, paracetamol e aciclovir na concentração de  $600 \mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a  $37^\circ\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzaimunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 19 - EFEITOS DA CIPROFLOXACINA SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



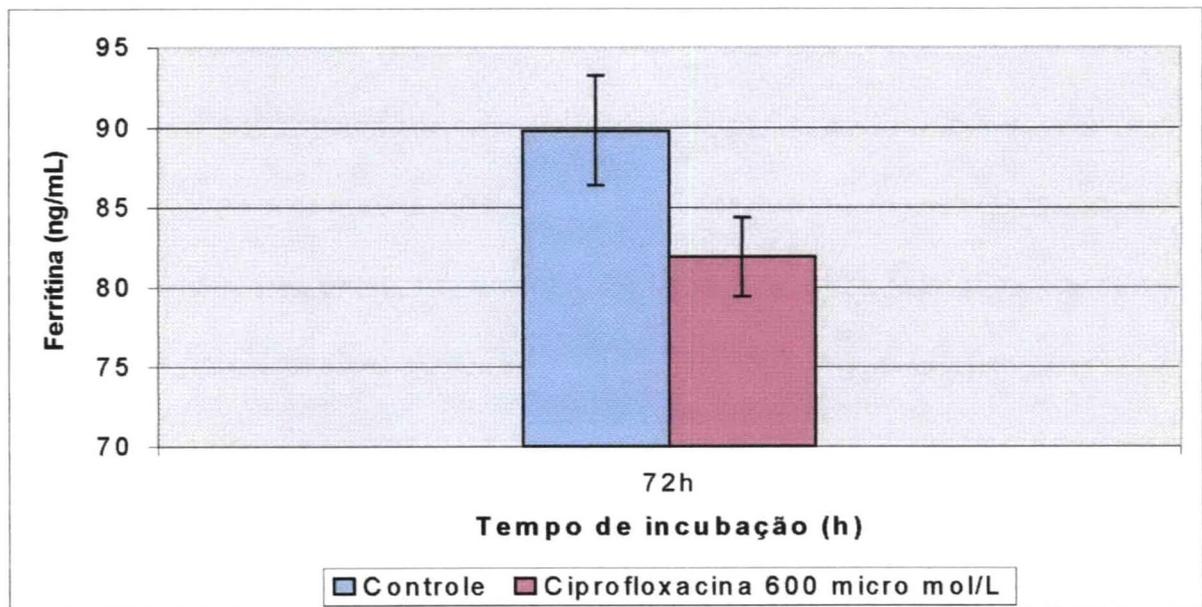
Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática ( $187,0 \pm 38,0$  ng/mL) contendo ciprofloxacin nas concentrações de 5, 10, 30, 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação a 37  $^{\circ}\text{C}$ , indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

TABELA 12 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA (600  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

Ciprofloxacina ( $\mu\text{mol/L}$ )	Ferritina (ng/mL)
0	89,8 $\pm$ 2,3
600	81,9 $\pm$ 2,8

Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática (93,5  $\pm$  19,0 ng/mL) contendo ciprofloxacina na concentração e tempo de incubação a 37 °C, durante 72h, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

FIGURA 20 - EFEITOS DA INCUBAÇÃO COM CIPROFLOXACINA (600  $\mu\text{mol/L}$ ) SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA



Sistema: Os volumes das soluções de ferritina plasmática (93,5  $\pm$  19,0 ng/mL) contendo ciprofloxacina na concentração de 600  $\mu\text{mol/L}$  e tempo de incubação a 37 °C, durante 72h, indicados acima, foram submetidos às reações de enzimaímunoensaio com micropartículas (MEIA), descritos no item 4.6. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão de 15 experimentos (triplicatas de 5 experimentos independentes) com nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISE DA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO MEIA (AXSYM – ABBOTT LABORATORIES) PARA DOSAGENS DE FERRITINAS DE ÓRGÃOS DIFERENTES.

A avaliação dos níveis plasmáticos e intracelulares do ferro no organismo, bem como o entendimento de etapas do metabolismo que envolvem a participação do íon, incluindo a síntese de hemoglobina, podem ser obtidos pela análise de um conjunto de dados laboratoriais que revelam diferentes aspectos das atividades compreendidas por este importante elemento. Este conjunto de dados laboratoriais, porém, em função de revelarem diferentes aspectos do metabolismo, nem sempre são concordantes entre si.

Os testes hematológicos baseados nas características dos eritrócitos, como por exemplo a concentração de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, e índice da anisocitose (rdw), são geralmente mais acessíveis e com menor custo que os testes bioquímicos. Por outro lado, os testes bioquímicos utilizados para avaliar a concentração de protoporfirina eritrocitária, saturação de transferrina e concentração de ferritina plasmática detectam com maior antecedência as alterações no metabolismo do ferro, oferecendo vantagem para a conduta terapêutica (YIP, 1989).

Embora a determinação da concentração de hemoglobina e do hematócrito não sejam suficientes para determinar a causa da anemia, o diagnóstico da anemia por deficiência de ferro pode ser estabelecido se a concentração de hemoglobina ou hematócrito aumentarem após a administração terapêutica de ferro suplementar (DALLMAN *et al.*, 1980; OSKI, 1993). Alternativamente outras determinações como o volume corpuscular médio, índice de anisocitose (rdw) e concentração de ferritina sérica podem ser utilizados como parâmetros para diferenciar a anemia por deficiência de ferro de outros fatores envolvidos com a instalação do quadro de anemia. A avaliação direta dos estoques de ferro usualmente requer amostras dos dois principais depósitos de ferro no organismo, a medula óssea e o fígado, acarretando

todos os riscos e inconvenientes de um procedimento invasivo. A aspiração e biópsia da medula óssea são preferíveis considerando serem mais seguras e mais habituais para os hematologistas que os procedimentos realizados no fígado. A quantificação da ferritina sérica, embora seja um método indireto, apresenta vantagens se comparado com a biópsia e aspiração, considerando avaliar satisfatoriamente os estoques de ferro, além de ser um procedimento não invasivo, com menores riscos de complicações, menos oneroso financeiramente e, portanto, mais aceitável pelos pacientes.

A concentração da ferritina sérica é o indicador mais precoce para a avaliação dos níveis de estoque de ferro, sendo também o parâmetro disponível que oferece melhores resultados para mensurar a depleção dos estoques, especialmente quando utilizado em associação com outros métodos. Podemos constatar estas observações se considerarmos uma paciente que apresente um diagnóstico presuntivo de anemia, baseado em concentrações de hemoglobina e na determinação do hematócrito, um resultado de ferritina sérica de 15 µg/L ou menos confirma a deficiência de ferro e concentrações de ferritina sérica superiores a 15 µg/L sugerem que a deficiência de ferro não é a causa da anemia (HALLBERG *et al.*, 1993). No estudo da deficiência de ferro em mulheres em idade fértil, utilizando valores de ferritina sérica, a sensibilidade deste parâmetro quando forem iguais ou inferiores a 15,0 µg/L é de 75 % e a especificidade é de 98 %; quando os níveis de ferritina sérica atingirem 12,0 µg/L ou menos, a sensibilidade para deficiência de ferro é de 61 % e a especificidade de 100 % (HALLBERG *et al.*, 1993). Considerando estes aspectos, a determinação da concentração de ferritina sérica parece ser o método de escolha para a avaliação dos estoques de ferro, contribuindo para o estabelecimento de um diagnóstico precoce de anemia por deficiência de ferro (FINCH, 1986).

Outros fatores, além dos níveis de estoque de ferro, podem resultar em grandes variações individuais na concentração da ferritina plasmática, mesmo em indivíduos saudáveis. Por tratar-se também de uma proteína de fase aguda, que pode ser ativamente secretada, inclusive regulada por citocinas (TRAN *et al.*, 1997), a ferritina plasmática está aumentada nas infecções crônicas, nas inflamações, ou em

patologias que causem danos em tecidos ou órgãos, como por exemplo nas hepatites, neoplasias, cirroses e artrite (COOPER & SLOTKIN, 1996).

É oportuno referir que estudos que apresentem como objetivo avaliar os níveis de estoques de ferro, utilizando como método indireto a dosagem de ferritina plasmática, devem validar os resultados obtidos mediante uma triagem preliminar dos pacientes, utilizando indicadores de doença inflamatória como, por exemplo, a proteína C reativa (PCR). Estes critérios de validação têm sido utilizados freqüentemente em estudos que envolvam comparação e avaliação de metodologias ou dosagens de ferritina (LOTZ *et al.*, 1999). Contudo, constatamos em nosso trabalho de revisão bibliográfica, que estes critérios de validação não têm sido observados em estudos e publicações em periódicos científicos voltadas para os laboratórios clínicos de rotina, onde os resultados das dosagens de ferritina sérica foram considerados integralmente, sem se considerar as interferências citadas anteriormente (THAME, 2000).

Aliando-se os aspectos favoráveis inerentes à dosagem de ferritina, a diminuição dos custos financeiros da metodologia, além de métodos clínicos ou fisiológicos para esta avaliação não estarem ainda disponíveis nas rotinas, houve um crescimento substancial na aplicação desta dosagem para a avaliação da deficiência de ferro. Inúmeras metodologias foram estabelecidas para a quantificação da ferritina sérica, conforme descrito anteriormente, algumas delas utilizando anticorpos monoclonais e padrões obtidos a partir de ferritina de fígado e outras utilizando ferritina de baço de cobaias. Alguns problemas metodológicos foram observados na comparação de resultados entre laboratórios e metodologias (BEATON *et al.*, 1989), contudo, foram reduzidos pelos programas de controle de qualidade, testes de proficiência e padronização dos métodos.

Na primeira etapa do nosso trabalho, quando avaliamos a especificidade do método frente a ferritinas de baço, fígado e coração, os resultados indicaram que, entre as ferritinas testadas, houve especificidade do método para a ferritina de baço (figura 6). Os dados da tabela 4 mostram percentuais de quantificação para a ferritina de baço próximos de 100%, indicando a alta relação entre a concentração utilizada e a

quantificada pelo método, mesmo havendo um melhor desempenho para as concentrações intermediárias (150 e 400 ng/mL) e caindo para 93 % e 96 % quando utilizamos concentrações de 20 ng/mL e 600 ng/mL respectivamente. Estes resultados de certa forma poderiam ser esperados se considerarmos que, em geral, são utilizados controles, padrões e calibradores reconhecidos imunologicamente pelos anticorpos monoclonais anti-ferritina obtidos a partir de camundongos e coelhos, porém no informe técnico do kit utilizado não pudemos encontrar a informação se os anticorpos monoclonais são anti- ferritina de baço. Esta informação, mesmo tendo sido solicitada diretamente ao fabricante, não foi obtida.

Os resultados para as dosagens de ferritina de fígado, constantes na tabela 4 e representados também na figura 6, indicaram que o sistema quantificou de 10 % a 18 % dos valores totais da concentração utilizada de ferritina de fígado. Se considerarmos o critério de composição da apoproteína, os resultados obtidos não refletem adequadamente a aparente similaridade entre a ferritina de fígado e a de baço. Apesar das duas ferritinas apresentarem predominância de cadeias leves L (2-3H : 21-22L), pode-se ter diferenças na composição de aminoácidos das cadeias na região de epítopo, ou mesmo a ausência de glicosilação na ferritina hepática que poderia afetar o reconhecimento pelos anticorpos monoclonais utilizados pelo sistema. Estudos de LUNEV *et al.* (1993), indicaram que a apoferritina, em função da flexibilidade conformacional, apresentou maior afinidade pelos anticorpos monoclonais que ferritinas ricas em ferro. A possibilidade de átomos de ferro, eventualmente presentes na ferritina hepática, interferirem na reação, pode ser questionada se considerarmos que a ferritina de baço, que também apresenta afinidade por átomos de ferro, não sofreu interferência aparente. Outra possibilidade a ser considerada, independente da composição proporcional de cadeias H e L, seria a própria distribuição destas cadeias na estrutura quaternária da molécula, sendo que os epítopos seriam formados por sequências de aminoácidos de diferentes subunidades, podendo inclusive envolver grande parte da superfície das subunidades (AROSIO *et al.*, 1990) ou mesmo apresentar inúmeros sítios antigênicos idênticos distribuídos na superfície protéica como indicaram estudos de ALLEN *et al* (1997). Uma possível explicação para o

percentual de quantificação de cerca de 10 % pode estar no processo de purificação da ferritina de fígado (intracelular), se considerarmos que neste órgão também é sintetizada a ferritina plasmática, que pode estar presente e ser quantificada pelo método, visto que as ferritinas sérica e intracelular são codificadas por homólogos, mas diferentes mRNAs, que interagem diferentemente com anticorpos específicos (TRAN *et al.*, 1997).

Estes resultados, de certa forma, permitem questionamentos sobre a capacidade do sistema em reconhecer a ferritina plasmática. Se considerarmos que os componentes imunoquímicos da metodologia, como descrito anteriormente, não reconheceram quantitativamente a ferritina de fígado que apresenta similaridades com a ferritina de baço, utilizada como padrão pela metodologia, fica a dúvida se reconheceria a ferritina plasmática, que também é sintetizada no fígado e ainda contém um componente glicosilado, cujo aumento na concentração, em casos de hepatoma, é atribuído ao aumento da síntese de ferritina plasmática. Estudos devem ser conduzidos no sentido de esclarecer esta aparente discordância, apesar do sistema, que utiliza ferritina de baço como referência, quantificar a ferritina plasmática no soro controle.

Para as dosagens de ferritina de coração, os resultados obtidos (figura 6 e tabela 4), em comparação com as concentrações utilizadas, foram próximos a zero (0 %). Estes valores indicam, provavelmente, que o anticorpo utilizado pela metodologia não é capaz de reconhecer a ferritina de coração, não ocorrendo a formação do complexo antígeno-anticorpo aderido as micropartículas, e, conseqüentemente, não permitindo a continuidade do processo de quantificação. Pode-se explicar que a formação do complexo imunoaderido não ocorreu, provavelmente, pelo fato de os anticorpos monoclonais utilizados serem específicos para ferritina de baço, como indicado pela metodologia do fabricante do sistema, que apresenta a estrutura da apoferritina rica em cadeias L, diferente, como relatado anteriormente, da ferritina de coração que apresenta a apoferritina com elevados índices de cadeias H, o que acarreta em diferenças imunológicas sensíveis ao sistema. Estes resultados confirmam o que teria sido observado por ROCHA (1998), utilizando o sistema COBAS CORE Ferritin EIA, da empresa ROCHE, onde verificou-se que o

anticorpo que faz parte do kit era capaz de reconhecer preferencialmente ferritinas com mais cadeias L. Em estudos conduzidos por MARESCHAL *et al.* (1981), os sistemas comerciais imunorradiométricos necessitaram concentrações seis vezes maiores de ferritina de coração, em relação à ferritinas de fígado e baço, para obtenção de resultados equivalentes. Possivelmente a detecção em concentração seis vezes maior deveu-se ao aumento da concentração de cadeias L, existente em pequeno número na estrutura da ferritina de coração. Considerando que as concentrações de ferritinas de coração, baço e fígado, avaliadas neste trabalho, foram entre 20 ng/mL e 600 ng/mL, observa-se um variação de trinta vezes na concentração entre os limites extremos, não indicando, mesmo nesta situação, que houve detecção da ferritina de coração.

Pode-se questionar, desta forma, que caso houvesse lesão de células hepáticas ou cardíacas e extravazamento destas ferritinas, possivelmente elas não seriam quantificadas adequadamente por esta metodologia, contrariando o que sugere o protocolo de um sistema comercial (Immunlite-DPCMedLab) que utiliza a metodologia de quimioluminescência, que é equivalente à utilizada neste trabalho.

Os mesmos aspectos de reconhecimento de ferritinas de coração e fígado foram observados nos resultados das dosagens de ferritinas utilizando-se misturas de duas ferritinas humanas de órgãos diferentes. Pode-se observar na tabela 5 e figura 7 que, na mistura contendo ferritina de baço e ferritina de coração, somente a de baço é reconhecida, sendo quantificada cerca de 50 %, correspondendo ao total de ferritina de baço adicionada à mistura. Nas misturas contendo ferritinas de baço e fígado os percentuais de reconhecimento aumentaram cerca de 10 %, correspondendo aos valores da ferritina de baço acrescidos de parte dos valores de ferritina de fígado, que é quantificada em torno de 10 %, conforme resultados constantes na tabela 4. Nas misturas de ferritinas de fígado e coração, somente em torno de 10 % do total de ferritinas adicionadas à mistura foram quantificados, correspondendo provavelmente à ferritina de fígado. Estes resultados confirmam os resultados obtidos para as ferritinas individuais, apresentados anteriormente.

Nas soluções contendo os três tipos de ferritinas teciduais, conforme resultados apresentados na tabela 6, verificamos que o sistema quantificou apenas em

torno de 30 % do total adicionado, valor equivalente a quantidade de ferritina de baço presente na mistura, com pequenas variações devidas, provavelmente á ferritina de fígado que é quantificada em 10 %. A tabela 6 e a figura 8 mostram também que as ferritinas não reconhecidas adequadamente pelos anticorpos utilizados na metodologia, não causam interferência na dosagem do constituinte que é quantificado pelo sistema (ferritina de baço), confirmando a especificidade do sistema.

## 6.2 ANÁLISE DOS EFEITOS DE FÁRMACOS SOBRE A DOSAGEM DE FERRITINA PLASMÁTICA HUMANA

A toxicidade de muitos xenobióticos é relatada pela habilidade destes compostos de sofrerem reações de óxido-redução ou de gerarem radicais livres através de reações dependentes de ferro. A ferritina representa uma possível fonte de ferro, caso o composto utilizado para análise seja capaz de liberá-lo do núcleo mineral da proteína, que ao mesmo tempo pode ser um alvo dos possíveis efeitos oxidativos dos radicais livres gerados, o que poderia comprometer sua dosagem pela metodologia utilizada neste trabalho.

Entre os compostos analisados neste trabalho dois deles são capazes de liberar ferro de ferritina, o metronidazol e a nitrofurantoína (MONTEIRO *et al.*, 1989). A tabela 7 e as figuras 9 a 13 mostram os resultados obtidos para a nitrofurantoína utilizando as concentrações de 50 a 600  $\mu\text{mol/L}$  e tempos de incubação de até 72 horas. Pode-se observar que no tempo de incubação de 24 horas, nas diferentes concentrações de nitrofurantoína até 400  $\mu\text{mol/L}$ , ocorre uma discreta diminuição nos resultados das dosagens de ferritina, o mesmo ocorrendo para os tempos de incubação de 48 e 72 horas também até a concentração de 400  $\mu\text{mol/L}$  (tabela 7 e figura 12). Estes resultados, porém, ainda encontram-se dentro dos coeficientes de variação da metodologia apresentados pelo fabricante (até 6,59 %), bem como do desvio padrão aceitável para a concentração de ferritina no soro controle ( $187,0 \pm 38,0 \text{ ng/mL}$ ). Nos tempos de incubação superiores a 24 horas na concentração de 600  $\mu\text{mol/L}$  (figura 13)

de nitrofurantoína observou-se um aumento nos valores das dosagens de ferritina, sendo observado o mesmo efeito para o controle. Este fato poderia ser explicado pela interferência do solvente DMF no processo de dosagem, considerando o já relatado possível efeito de solventes orgânicos sobre a conformação dos anticorpos, resultando em aumento da afinidade (MELNIKOVA, *et al.*, 2000) o que não teria sido observado com os demais fármacos que foram utilizados em solução aquosa (tabelas 8 a 11). Utilizando-se o metronidazol nos mesmos parâmetros, porém tendo como solvente do fármaco a água, verificou-se também que nas condições propostas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas doses e tempos de incubação indicados (tabela 8 e figuras 14 a 18).

O paracetamol é o fármaco de primeira escolha em substituição ao ácido acetil salicílico como analgésico e antiinflamatório. Contudo, casos de lesões hepáticas e alterações hematológicas podem ser observadas com doses mais elevadas (REYNOLDS *et al.*, 1989). Verificou-se também que durante a metabolização do paracetamol é produzida uma quinoneimina reativa, que pode atacar proteínas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), sendo assim, seria interessante verificar-se a possibilidade deste fármaco afetar também as análises de concentração de ferritina. As figuras 14 a 18 e a tabela 9 mostram os resultados obtidos utilizando o paracetamol, onde pode-se observar que não ocorreram alterações estatisticamente significativas nas condições propostas.

O aciclovir é um antiviral utilizado no tratamento de infecções por *Herpes simplex* e também em formulações (coquetéis) indicados para o tratamento de AIDS, onde com frequência se observa um aumento da concentração plasmática de ferritina (LEE & MEANS, 1995). Entre os seus principais efeitos adversos inclui-se a nefrotoxicidade e alterações nos níveis de enzimas hepáticas. Nas figuras 14 a 18 e tabela 10, observamos que nas condições propostas não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre as amostras controle e as tratadas com o fármaco nos diferentes tempos de incubação.

Cabe esclarecer que as concentrações dos fármacos foram utilizadas dentro dos parâmetros terapêuticos, observando diferenças e extremos possíveis nos níveis de

concentração terapêutica plasmática que permitissem avaliar esta variante. Estas concentrações estabelecem uma relação fármaco / proteína específica para cada concentração da droga e de ferritina no experimento. Se forem consideradas as concentrações de ferritina no soro controle de  $187,0 \pm 38,0$  ng/mL e as concentrações de 50, 100, 200, 400 e 600  $\mu\text{mol/L}$  de nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol e aciclovir, a relação fármaco / proteína seria de 0,014, 0,028, 0,056, 0,112 e 0,168 mol/g respectivamente.

A ciprofloxacina mostrou-se capaz de gerar radicais livres durante o seu metabolismo em microssomas hepáticos (GÜRBAY *et al.*, 2001). Verificou-se também que seus efeitos fototóxicos estão relacionados com a geração de espécies reativas de oxigênio, incluindo peróxido de hidrogênio e radical hidroxila (WAGAI *et al.*, 1991). O radical hidroxila é bastante reativo, podendo reagir com várias moléculas orgânicas, inclusive proteínas, o que sugeriria a possibilidade deste fármaco poder alterar a estrutura da ferritina e assim afetar os resultados de sua dosagem. Contudo, quando utilizou-se a ciprofloxacina nas concentrações entre 5 e 100  $\mu\text{mol/L}$  não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (tabela 11 e figura 19). Nos experimentos conduzidos para verificar a interferência da ciprofloxacina sobre a metodologia para a dosagem de ferritina plasmática, utilizou-se concentrações, como anteriormente discutido para os demais fármacos, próximas à terapêutica, porém diferente dos demais, sendo de 5, 10, 30, 50, 100  $\mu\text{mol/L}$ , onde as relações fármaco / proteína foram respectivamente de 0,0014, 0,0028, 0,0084, 0,014 e 0,024 mol/g.

Com o objetivo de verificar se alterações na relação fármaco / proteína poderiam acarretar em interferências significativas na metodologia, foram realizados experimentos alterando esta relação, considerando as até então observadas. Em um experimento inicial alterou-se a concentração da proteína de  $187,0 \pm 38,0$  ng/mL anteriormente utilizada, para cerca de  $40,0 \pm 8,0$  ng/mL, utilizando-se os mesmos tempos de incubação na concentração de 1200  $\mu\text{mol/L}$  para os compostos hidrossolúveis (paracetamol, ciprofloxacina e metronidazol) e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas (dados não mostrados). Nestas condições a relação fármaco / proteína foi de 30,0 mol/g. Contudo, quando utilizou-se a

ciprofloxacina a 600  $\mu\text{mol/L}$  (dose máxima utilizada para os demais fármacos na etapa inicial deste trabalho), equivalendo a uma concentração plasmática de 231,6  $\mu\text{g/mL}$  e uma concentração de ferritina de  $93,5 \pm 19,0$   $\text{ng/mL}$ , observou-se uma diminuição de cerca de 10 %, conforme indicado na tabela 12 e figura 20, estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ). Nestas condições específicas, descritas no item 4.5, além do aumento na concentração da ciprofloxacina para níveis acima do terapêutico, ocorreu uma maior diluição da solução de ferritina de cerca da metade utilizada anteriormente, e em consequência um aumento na relação fármaco / proteína para 3,2  $\text{mol/g}$ , acima da utilizada na primeira etapa deste trabalho. Desta forma verifica-se que a relação fármaco / proteína poderia afetar os resultados anteriormente obtidos.

Deve-se considerar que em condições fisiológicas, em função dos níveis plasmáticos da ferritina, da concentração de outras proteínas plasmáticas, como por exemplo a albumina que podem também ligar-se ao fármaco diminuindo a disponibilidade no meio, bem como da concentração do próprio fármaco e de seus derivados metabólicos, esta relação fármaco / proteína pode sofrer variações significativas que viriam a determinar possíveis efeitos com interferência na quantificação da ferritina. Estas variações na relação fármaco / proteína também poderiam ser observadas em condições patológicas, como por exemplo em estados de hipoalbuminemia ou em anemias por deficiência de ferro com baixos níveis de ferritina, ou mesmo em disfunções hepáticas ou renais onde os componentes desta relação poderiam ser afetados, visto que comprometimentos hepáticos poderiam afetar tanto a síntese de ferritina quanto a metabolização do fármaco, além de nefropatias que poderiam comprometer sua eliminação.

Deve-se considerar ainda que á semelhança do que aconteceria no plasma, outras proteínas podem ter sido alvo dos efeitos dos fármacos estudados, e que não foram analisadas neste trabalho, diminuindo a ação sobre a ferritina, bem como poderíamos ter a atividade de outros componentes com capacidade protetora contra agentes oxidantes existentes no soro (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1999), que podem ter sido influenciados pela quantidade de proteína e diluições utilizadas.

## 7 CONCLUSÃO

Considerando os dados obtidos nos experimentos relatados e discutidos anteriormente, e as informações do levantamento bibliográfico, podemos apresentar as seguintes conclusões:

- a) A metodologia para a dosagem de ferritina plasmática, utilizando enzimaímunoensaio com micropartículas e anticorpos monoclonais, quando testada frente à ferritinas de coração, fígado e baço, apresentou especificidade e sensibilidade para ferritina de baço, não quantificando adequadamente as outras duas ferritinas testadas;
- b) Considerando a especificidade dos anticorpos monoclonais e os dados que obtivemos nas dosagens de ferritina de fígado com a metodologia em estudo (quantificando apenas 10 % da concentração), elevações na concentração de ferritinas no plasma, decorrentes de lesão hepática com extravasamento de ferritina intracelular, não pode ser mensurada satisfatoriamente pelo método .
- c) No estudo de possíveis interferências na metodologia causadas por fármacos (nitrofurantoína, metronidazol, paracetamol, aciclovir e ciprofloxacina) em concentrações próximas à terapêutica, não foram observados resultados com variações significativas que sugiram a interferência na metodologia em determinadas concentrações, relação fármaco / ferritina e tempos de incubação em ensaios *in vitro*. Utilizando ciprofloxacina na concentração de 600  $\mu\text{mol/L}$ , observou-se uma variação nos resultados cerca de 10 % menores em relação ao controle, sendo estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ), para uma relação fármaco / proteína de 3,2 mol/g, indicando uma possível interferência desta relação nos resultados obtidos e sugerindo a possibilidade deste medicamento poder afetar a estrutura desta proteína nas condições estudadas.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT LABORATORIES .(1998) **Ferritin – Axsym system**. Informe técnico.
- ADDISON, G.M.; BEAMISH, M.R.; HALES, C.N. (1972) An immunoradiometric assay for ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. **Journal of Clinical Pathology**. n. 25, p. 326-329.
- AISEN, P.; LISTOWSKY, I. (1980) Iron transport and storage proteins. **Annual Review of Biochemistry**. n.49, p.357-393.
- ALLEN, S.; CHEN, X.; DAVIES, J.; DAVIES, M.; DAWKES, A.; EDWARDS, J.C.; ROBERTS, C.J.; SEFTON, J.; TENDLER, S.; WILLIAMS, P. (1997) Detection of antigen-antibody binding events with the atomic force microscope. **Biochemistry**. n. 36, p.7457-7463.
- AROSIO, P.; COZZI, A.; INGRASSIA, R.; LEVI, S.; LUZZAGO, A.; RUGGERI, G.; IACOBELLO, C.; SANTAMBROGLIO, P.; ALBERTINI, A. (1990) A mutational analysis of the epitopes of recombinant human H-ferritin. **Biochemistry and Biophysic Acta**. n. 1039, p. 197-203.
- AROSIO, P.; PONZONE, A.; FERRERO, R.; RENOLDI, I.; LEVI, S. (1986) Characteristics of ferritins in human milk secretion: similarities to serum and tissue isoferritins. **Clinical Chemistry Acta**. n. 161, p. 201-208.
- AROSIO, P.; ADELMAN, T.G.; DRYSDALE, J.W. (1978) On ferritin heterogeneity: further evidence for heteropolymers. **Journal of Biological Chemistry**. n. 253, p. 4451-4458.
- AROSIO, P.; YOKODA, M.; DRYSDALE, J.W. (1977) Characterization of serum ferritin in iron overload: possible identity to natural apoferritins. **British Journal of Haematology**. n. 36, p. 199-207.
- AZIZ, N.; MUNRO, H.N. (1986) Both subunits of rat liver ferritin are regulated at a translational level by iron induction. **Nucleic Acids Research**. n. 14, p. 915-927.
- BAINTON, D.F.; FINCH, C. A. (1964) The diagnosis of iron deficiency anemia. **American Journal of Medicine**. n. 37, p. 62-67
- BALABAN, E. P.; SHEEHAN, R. G.; DEMIAN, S. E.; COX, J. V.; FRENKEL, E. P. (1993) Evaluation of bone marrow iron stores in anemia associated with chronic disease: a comparative study of serum and red cell ferritin. **American Journal Hematology**. n. 42, p.177-182.
- BAUMINGER, E.R.; TREFFRY. A.; HUDSON, A.J.; HECHEL, D.; HODSON, N.W.; ANDREWS, S.C.; LEVI, S.; NOWIK, I.; AROSIO, P.; GUEST, J.R.;

HARRISON, P.M. (1994) Iron incorporation into ferritins: evidence for the transfer of monomeric Fe (III) between ferritin molecules and for the formation of an unusual mineral in the ferritin of *Escherichia coli*. **Biochemistry Journal**. n. 302, p. 813-820.

BAUMINGER, E.R.; HARRISON, P.M.; HECHEL, D.; NOWIK, I.; TREFFRY, A. (1991) Mossbauer spectroscopic investigation of structure-function relations in ferritins. **Biochemistry and Biophysic Acta**. n.1118, p. 48-58.

BEATON, G.H.; COREY, P.N.; STEELE, C. (1989) Conceptual and methodological issues regarding the epidemiology of iron deficiency and their implications for the studies of the functional consequences of iron deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**. n. 50, p. 575-588.

BEUTLER, E.; COLLER, B.; MARSHALL, A.L.; THOMAS, J.K. (Ed.) (2000) **Williams Hematology**. 6 th Edition. McGraw-Hill. New York. p. 295-502

BOTHWELL, T.H. (1995) Overview and mechanisms of iron regulation. **Nutrition Review**. v. 9, n. 53, p. 237-245.

BOYD, D.; VECOLI, C.; BELCHER, D.M.; JAIN. S.K.; DRYSDALE, J.W. (1985) Structural and functional relationships of human ferritin H and L chains deduced from cDNA clones. **Journal of Biological Chemistry**. n.260, p. 11755-11761.

BRIAT, J.F.; LAULHERE, J.P.; LABOURE, A.M.; PROUDHON, D.; LESCURE, A.M. (1989) in **Metal Ion Homeostasis: Molecular Biology and Chemistry**. Alan R. Liss. n. 5, p. 289-315.

BROXMEYER, H.E.; BOGNACKI, J.; RALPH, P.; DORNER, M.H.; DE SOUSA, M.(1981) Identification of leukemia-associated inhibitory activity as acidic isoferritins. A regulatory role for acidic isoferritins in the production of granulocytes and macrofages. **Journal of Experimental Medicine**. n. 153, p. 1426-1444.

CAZZOLA, M.; SKODA, R.C. (2000) Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. **Blood**. v. 95, n. 11, p. 3280-3288.

CAZZOLA, M.; BERGAMASCHI, G.; TONON, L.; ARBUSTINI, E.; GRASSO, M.; VERCESI, E.; BAROSI, G.; BIANCHI, P.E.; AROSIO, P. (1997) Hereditary hyperferritinemia – cataract syndrome: relationship between phenotypes and specific mutations in the iron-responsive element of ferritin light-chain mRNA. **Blood**. n. 90, p. 814-821.

CDC – CENTER FOR DESEASE CONTROL AND PREVENTION-USA (2001). Update: investigation of anthrax associated with intentional exposure and interim public health guidelines, october 2001. **MMWR 2001**. n. 50, p. 889-897.

- COHEN, A.; MARTIN, M.; SCHWARTZ, E. (1981) Response to long-term Deferoxamine therapy in Thalassaemia. **Journal of Pediatrics**. v. 5, n. 99, p. 689-694.
- COOK, J.D; FINCH, C.A. (1979) Assessing iron status of a population. **American Journal of Clinical Nutrition**. n. 32, p. 2115-2119.
- COOPER, M.J.; ZLOTKIN, S.H.(1996) Day-to-day variation of transferrin receptor and ferritin in health men and women. **American Journal of Clinical Nutrition**. n. 64, p. 738-742.
- COVELL, A.M.; COOK, J.D. (1988) Interactions of acidic isoferritins with human promyelocytic HL60 cells. **British Journal of Haematology**. n. 69, p. 559-563.
- CRAVEN, C.M.; ALEXANDER, J.; ELDRIDGE, M.; KUSCHER, J.P.; BERNSTEIN, S.; KAPLAN, J. (1987) Tissue distribution and clearance kinetics of non-transferrin-bound iron in the hypotransferrinemic mouse: a rodent model for hemochromatosis. **National Academy of Science**. n. 4, p. 3457-3461.
- CRICHTON, R.R; MILLER, J.A; CUMMING, R.L.C; BRYCE, C.F.A. (1973) The organ-specificity of ferritin in human and horse liver and spleen. **Biochemistry Journal**. n. 131, p. 51-59.
- DALLMAN, P.R; LOOKER, A.C.; JOHNSON, C.L. *et al.* (1996) Influence of age on laboratory criteria for the diagnosis of iron deficiency anemia and iron deficiency in infant and children. *In*: HALLBERG, L. Asp Ng eds. **Iron nutrition in health and disease**. London UK. p. 65-74.
- DALLMAN, P.R; SIIMES, M.A.; STEKEL, A. (1980) Iron deficiency in infancy and childhood. **American Journal of Clinical Nutrition**. n. 33, p. 86-118.
- DEMAEYER, E.M. (1989) **Preventing and controlling iron deficiency anaemia through primary health care: a guide for health administrators and programme managers**. Geneva, WHO. p. 07-16.
- DESIDERI, A.; STEFANINI, S.; POLIZIO, F.; PERRUZZELI, R.; CHIANCONE, E. (1991) Iron entry route in horse spleen apoferritin. Involvement of three-fold channels as probed by selective reaction of cysteine – 126 with the spin label 4. **FEBS Letters**. n. 287, p.10-14.
- DIETZEL, J.; HIRZMANN, J.; PREIS, D.; SYMMONS, P.; KUNZ, W. (1992) Ferritins of *Schistosoma mansoni*: sequence comparison and expression in female and male worms. **Molecular Biochemistry in Parasitology**. n. 50, p. 245-254.
- DOMINGO, N.B.D.; CARBIA, C.; ARTANZA, J.R.; CEBALLO, M.F.; (1997) Red cell ferritin – measurement and diagnostic applications. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**. v. 4, n.31, p. 415-419.

- DONOVAN, J.W.(1983) **Methemoglobinemia**. In: Haddad L.M. & Winchester J. F. eds. *Clinical Management of Poisoning and Drug Overdose*. Philadelphia. p. 905-909.
- FAIRBANKS, V.F.; FAHEY, J.L.; BEUTLER, E. (1971) **Clinical disorders of iron metabolism**. 2<sup>nd</sup> ed., Grune and Stratton Inc, New York. p. 46-54
- FARGION, S.; CAPPELLINI, M.D.; FRACANZANI, A.L.; DEFEO, T.M.; LEVI, S.; AROSIO, P.; FIORELLI, G. (1992) Binding and suppressive activity of human recombinant ferritins on erythroid cells. **American Journal of Hematology**. n. 39, p. 264-268.
- FINCH, C.A; BELLOTTI, V; STRAY, S; LIPSCHITZ, D.A; COOK, J.D; PIPARD, M.J; HUEBER, H.A.(1986) Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. **West Journal of Medicine**. n. 145, p. 657.
- FINCH, C. A.; COOK, J.D.(1984) Iron deficiency. **American Journal of Clinical Nutrition**. n. 39, p. 471-477.
- FORD, G.C.; HARRISON, P.M.; RICE, D.W.; SMITH, J.M.A.; TREFFRY, A.; WHITE, J.L.; YARIV, Y. (1984) Ferritin: design and formation of an iron-storage molecule. **Physiology Royal Society**. n. 304B, p. 551-565.
- FRANCANZANI, A.L.; FARGION, S.; ROMANO, R.; PIPERNO, A.; AROSIO, P.; RUGGIERI, G.; RONCHI, G.; FIORELLI, G. (1989) Immunohistochemical evidence for a lack of ferritin in duodenal absorptive epithelial cells in idiopathic hemochromatosis **Gastroenterology**. n. 96, p. 1071-1078.
- FUNK, F.; LENDERS, J.P.; CRICHTON, R.R.; SCHENEIDER, W. (1985) Reduction and mobilisation of ferritin iron. **European Journal of Biochemistry**. n. 152, p.167-172.
- GREEN, R.; CHARLTON, R.; STEFFEL, H. *et al.*(1968) Body iron excretion in man: a collaborative study. **American Journal of Medicine**. n. 45, p. 336-353.
- GÜRBAY, A.; GONTHIER, B.; DAVELOOSE, D.; FAVIER, A.; HINCAL, F. (2001) Microsomal metabolism of ciprofloxacin generates free radicals. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 10, n. 30, p. 1118-1121.
- HALLBERG, L.; BENGTTSSON, C.; LAPIDUS, L.(1993) Screening for iron deficiency: an analysis based on bone-marrow examinations and serum ferritin determinations in a population sample of women. **British Journal of Haematology**. n. 85, p. 787-798.
- HALLBERG, L. (1981) Bioavailability of dietary iron in man. **Annual Review of Nutrition** . n. 1, p. 123-147.

HALLIDAY, J.W.(1982) Immunoassay of ferritin in plasma. **Methods in Enzymology**. n. 84, p. 148-171.

HALLIWELL, A.; GUTTERIDGE, C. (1999) **Free Radical Biology & Medicine**. Third Edition. p. 576-577.

HARRISON, P.M.; AROSIO, P. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochemistry and Biophysics Acta**. n. 1275, p. 161-203.

HARRISON, P.M., BAUMINGER, E.R., HECHEL, D., HODSON, N.W., NOWIK, I., TREFFRY, A.; YEWDALL, S.J. (1994) *In Progress in Iron Research* (Hershko, C.; Konijn, A.; Aison, P. eds.) Plenum Press, New York. p. 1-12.

HARRISON, P.M.; ANDREWS, S.C.; ARTYMIUK, P.J.; FORD, G.C.; GUEST, J.R.; HURZMANN, J.; LAWSON, D.M.; LIVINGSTONE, J.C.; SMITH, J.M.A.; TREFFRY, A.; YEWDALL, S.J. (1991) Probing structure-function relation in ferritin and bacterioferritin. **Advanced Inorganic Chemistry**. n. 36, p. 449-486.

HAYEM, G.; PETIT, L.X.; LEVACHER, M.; GAUDIN, C.; KAHN, M.F.; POCIDALO, J.J. (1994) Cytofluorometric analysis of chondrotoxicity of fluoroquinolone antimicrobial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. n. 38, p. 243-247.

HAZARD, J.T; YOKODA, M; AROSIO, P; DRYSDALE, J.W.(1977) Immunologic differences in human isoferritins: Implications for immunologic quantitation of serum ferritin. **Blood**. n. 49, p. 139-146.

HEADING, R.C. *et al.* (1973) The dependence of paracetamol absorption on the rate of gastric emptying. **British Journal of Pharmacy**. n. 47, p. 415-421.

HELMER-CITTERICH, M.; ROUIDA, E.; LUGAZZO, A.; TRAMONTANO, A. (1995) Modelling antibody-antigen interactions: ferritin as a case study. **Molecular Immunology**. n. 32, p. 1001-1010.

HOENER, B. A.; PATTERSON, S. E. (1981). Nitrofurantoin disposition. **Clinical Pharmacy and Therapy**. n. 29, p. 808-816.

HOOPER, D.C.; WOLFSON, J.S.(1985) The fluoroquinolones: pharmacology, clinical uses, and toxicities in human. **Antimicrobial Agents Chemother.** n. 28, p. 716-721.

IZUHARA, M.; TAKAMUNE, K.; TAKATA, R. (1991) Cloning and sequencing of an *Escherichia coli* K12 gene which encodes a polypeptide having similarity to the human ferritin H subunit. **Molecular Genetics**. n. 225, p. 510-513.

JACOBS, A. (1977). A iron overload-clinical and pathologic aspects. **Seminary Haematology**. n. 14, p. 89.

JACOBS, A.; MILLER, F.; WORWOOD, M.(1972) Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. **British Journal of Medicine**. n. 4, p. 206-208.

JACOBS, A.; WORWOOD, M. (1975) Ferritin in serum and Biochemical Implications. **New England Journal of Medicine**. n. 292, p. 951-956.

JENSEN, J.C.; GUGLER, R. (1983) Single- and multiple-dose metronidazole kinetics. **Clinical Pharmacology and Therapy**. n. 34, p. 481-487.

JONES, T.; SPENCER, R.; WALSH, C. (1978) Mechanism and kinetics of iron release from ferritin by dihydroflavins and dihydroflavins analogues. **Biochemistry**. n. 17, p. 4011-4017.

KONJIN, A.K.; MEYERON-HOLTZ, E. G.; LEVY, R.; BEM-BASSAT, H.; MATZNER, Y. (1990) Specific binding of placental acidic isoferritin to cells of the T-cell line HD-MAR. **FEBS Letters**. n. 263, p. 229-232.

LAPPONI, J.C. (2000) **Estatística usando Excel**. São Paulo. Lapponi Treinamentos e Editora. p. 27-63.

LEE, M.H.; MEANS, R.T. Jr (1995) Extremely elevated serum ferritin levels in a university hospital: associated diseases and clinical significance. **American Journal of Medicine**. n. 98, p. 556-571.

LEE, R.G.; BITHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W.; LUKENS, J.N. (1998) **Wintrobe Hematologia Clínica**. 1ª ed. Editora Manole. São Paulo. Brasil. p. 183-207.

LIPSCHITZ, D.A.; COOK, J.D.; FINCH, C.A. (1974) A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. **New England Journal of Medicine**. n. 290, p. 1213.

LOTZ, J.; HAFNER, G.; PRELLWITZ, W. (1999) Reference values for a homogeneous ferritin assay and traceability to the 3rd International Recombinant Standard for ferritin (NIBSC code 94/572). **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v. 8, n. 37, p. 821-825.

LUNEV, V.E.; MELNIKOVA, I.I.; KOSHKIN, S.A.; LUNEVA, N.M.; CHERKESOVA, T.S.; VASILEVSKAIA, I.A.; PREIGERZON, V.A.; MARTSEV, S.P. (1993) Monoclonal antibodies to human spleen ferritin. Preparation and study of the interaction with isoferritin and apoferritin. **Biokhimiia**. 58(5):745-758.

MADANI, N.; LINDER, M.C.; (1992) Differential effects of iron and inflammation on ferritin synthesis of free and membrane-bound polyribosomes. **Archives of Biochemistry and Biophysic.** n. 299, p. 206.

MARESCHAL, J.C.; DUBLET, B.; WUSTEFELD, C.; CHARLIER, G.; CRICHTON, R.R. (1981) Immunological characteristics of human ferritins; consequences for human serum ferritin determination. **Clinical Chemistry Acta.** v. 1, n. 111, p. 99-103.

MELNIKOVA, Y.I.; ODINTSOV, S.G.; KRAVCHUK, Z.I.; MARTSEV, S.P. (2000) Antigen-binding activity of monoclonal antibodies after incubation with organic solvents. **Biochemistry.** v. 11, n. 65, p. 1256-1265.

MELO, J.M.S. (Ed) (1999) **Dicionário De Especialidades Farmacêuticas: DEF 1999/2000.** 28<sup>a</sup> ed. Ed. Publicações Científicas. Rio de Janeiro. p. 201- 636.

MILES, L.E.M.; LIPSCHITZ, D.A.; BIEBER, C.P.; COOK, J.D. (1974) Measurement of serum ferritin by a 2-site immunoradiometric assay. **Analytical Biochemistry.** n. 25, p. 326-329.

MOFFAT, A. C.; JACKSON, J.V.; MOSS, M.S.; WIDDOP, B. (Ed.) (1986) **Clarke's -Isolation and identification of drugs.** 2<sup>nd</sup> edition. The Pharmaceutical Press. London. England. p. 780-850.

MONTEIRO, H.P.; VILE, G.F.; WINTERBOURN, C.C.(1989) Release of iron from ferritin by semiquinone, anthracycline, bipyridyl and nitroaromatic radicals. **Free Radical Biology & Medicine.** n. 6, p. 587-591.

MOORE, G.R.; KADIR, F.H.A.; AL-MASSAD, F.(1992). Haem binding to ferritin and possible mechanisms of physiological iron uptake and release by ferritin. **Journal of Inorganic Biochemistry.** n. 47, p. 175-181.

MOSS, D.; FARGION, S.; FRANCANZANI, A.L.; LEVI, S.; CAPPELLINI, M.D.; AROSIO, P.; POWELL, L.W.; HALLIDAY, J.W. (1992). Functional roles of the ferritin receptors of human liver hepatoma, lymphoid and erythroid cells. **Journal of Inorganic Biochemistry.** n. 47, p. 219-227.

MUNRO, H.N.; LINDER, M.C. (1978). Ferritin: structure, biosynthesis and role in iron metabolism. **Physiology Review.** n. 58, p. 317-396.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (1992). **Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices – Second Edition.** NCCLS Document EP5-T2.

OSKI, F.A.(1993) Iron deficiency in infancy and childhood. **New England Journal of Medicine.** v. 3, n. 329, p. 190-193.

- OSTERLOH, K.; AISEN, P. (1989) Pathways in the binding and uptake of ferritin by hepatocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 1011, p. 40-45.
- OTEIZA, P.I.; KLEINMAN, C.G.; DEMASI, M.; BECHARA, E.J.H. (1995) 5-Aminolevulinic acid induces iron release from ferritin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. n. 316, p. 607-611.
- POWELL, L.W.; HALLIDAY J.W.; MCKEERING, L.V.; TWEEDALE, R. (1977) Alterations in serum and tissue isoferritins in disease states. II. Hemochromatosis and malignant disease, *In* Brown E.B.(ed): **Proteins of iron metabolism**. Ed. Grune & Stratton. New York. p. 61.
- RAMM, G.A.; BRITTON, R.S.; O'NEIL, R.; BACON, B.R. (1994) Identification and characterization of a receptor for tissue ferritin on activated rat lymphocytes. **Journal of Clinical Investigation**. n. 94, p. 9-15.
- REYNOLDS, E.F.; PARFITT, K.; PARSONS, A.V.; SWEETMAN, S.C. (Ed) (1989) **Martindale. The Extra Pharmacopeia**. 29<sup>th</sup> ed. London. England. p. 224-673.
- REVENANT. M.C.; GOUDABLE, J.; BEAUDONNET, A.; MAILLIAVIN, A.; PICHOT, J.; MONNET, L.(1985) Determination of serum ferritin by a one-step immunoenzymoassay, and comparison of four liver-ferritin standards. **Clinical Chemistry**. v. 4, n. 31, p. 640-642.
- RICHARDSON, D.R.; PONKA, P. (1997) The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. **Biochimica et Biophysica Acta**. n. 1331, p. 1-40.
- ROCHA, M. E. M.(1998) **Estudos *in vivo* e *in vitro* da indução da liberação de ferro de ferritina promovido pelo ácido 5-aminolevulínico**. São Paulo. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo.
- ROCHA, M.E.M.; FERREIRA, A.M.D.C.; BECHARA, E.J.H. (2000) Roles of phosphate and enoyl radical in ferritin iron mobilization by 5-Aminolevulinic acid. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 12, n. 29, p. 1272-1279.
- ROCHE LABORATORIES. (1996) Cobas Core Ferritin EIA. Informe técnico.
- ROGERS, J.; MUNRO, H.N. (1987) Translation of ferritin light and heavy subunit mRNAs is regulated by intracellular chelatable iron levels in rat hepatoma cells. **National Academy of Science**. n. 84, p. 2277-2281.
- RUGGIERI, G.; IACOBELLO, C.; ALBERTINI, A.; BROCHI, E.; LEVI, S.; GABRI, E.; AROSIO, P.(1984) ***In Ferritins and Isoferritins as Biochemical Markers*** (Albertini, A.; Arosio, P.; Drysdale, J.W., eds.). Elsevier, Amsterdam. p. 67-68..

- SANTAMBROGLIO, P.; COZZI, A.; LEVI, S.; AROSIO, P. (1987). Human serum ferritin G-peptide is recognized by anti L-ferritin subunit antibodies and concavalin-A. **British Journal of Haematology**. n. 65, p. 235-237.
- SCHETTINI, F.; MAUTONE, A.; CAVALLO, L.; AUTOMARE, M.; MONTAGNA, O.; DELL'EDERA, L. (1981) Delayed decrease in serum ferritin in polytransfused children with Thalassemia major after continuous subcutaneous infusions of Desferrioxamine. **Acta Haematologica**. n. 66, p. 99-101.
- SIBILE, J.C.; KONDO, H.; AISEN, P. (1988). Interactions between isolated hepatocytes and Kupffer cells in iron metabolism: a possible role for ferritin as an iron carrier protein. **Hepatology**. n. 8, p. 296-301.
- SIMON, M.; BRISSOT, P. (1988). The genetics of haemochromatosis. **Journal of Hepatology**. n. 6, p. 116-124.
- SKIKNE, B.; BAYNES, R.D. (1994) Iron absorption. *In*: Brock, J.H; Halliday, J.W; Pippard, M.J; Powell, L.W. Eds. **Iron metabolism in health and disease**. W.B. Saunders. London, UK. p. 151-187.
- SKIKNE, B.S.; WHITTAKER, P.; COOK, A.; COOK, J.D. (1995). Ferritin excretion and iron balance in humans. **British Journal of Haematology**. n. 90, p. 681-687.
- STACY, D.L; HAN, P. (1992) Serum ferritin measurement and the degree of agreement using four techniques. **American Journal of Clinical Pathology**. n. 98, p. 511-515.
- STADMAN, E.R. (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. **Free Radical Biology & Medicine**. n. 9, p. 315-325.
- STEFANINI, S.; VECCHINI, P.; CHIANCONE, E. (1987). On the mechanism of horse spleen apoferritin assembly: a sedimentation velocity and circular dichroism study. **Biochemistry**. n. 26, p. 1831-1837.
- THAME, G. (2000) Níveis de hemoglobina, folato e ferritina segundo o tempo de gestação. **NewsLab**. n. 39, p. 80-86.
- TRAN, T.N.S. K.; EUBANKS, K. J.; SCHAFFER, C. Y. J.; LINDER, M.C. (1997) Secretion of ferritin by rat hepatoma cells and its regulation by inflammatory cytokines and iron. **Blood** . v. 12, n. 90, p. 4979-4986.
- TREFFRY, A.; ZHAO, Z.; QUAIL, M.A.; GUEST, J. R.; HARRISON, P.M. (1997). Dinuclear center of ferritin: studies of iron binding and oxidation show differences in the two iron sites. **Biochemistry**. n. 14, p. 432- 441.

TREFFRY, A.; HARRISON, P.M.; CLETON, M.I.; DEBRUIJN, W.C.; MANN, S. (1987) A note on the composition and properties of ferritin iron cores **Journal of Inorganic Biochemistry**. n. 31, p. 1-6.

WÄCHTERSCHÄUSER, G.(1992). Groudworks for an evolutionary biochemistry: the iron-sulphur world. **Progress in Biophysic and Molecular Biology**. n. 58, p. 85-201.

WADE, V.J.; LEVI, S.; AROSIO, P.; TREFFRY, A.; HARRISON, P.M.; MANN, S. (1991). Influence of site-directed modifications on the formation of iron cores in feritin. **Journal of Molecular Biology**. n. 221, p. 1443-1452.

WAGAI, N.; TAWARA, K. (1991) Quinolone antibacterial agent induced cutaneous phototoxicity: ear-swelling reaction in BALB/c mice. **Toxicology Letter**. n. 58, p. 215-223.

YIP, R. (1989) Iron nutritional status defined. *In*: Filer L.J. Jr., ed. **Dietary iron: birth to two years**. Raven Press. New York, N.Y. p. 19-36.

ZÄHRINGER, J.; BALIGA, B.S.; MUNRO, H. N.(1976) Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. **National Academy of Science**. n.73, p. 857-864.