

APLICAÇÕES NA ÁREA DA SAÚDE E MEIO AMBIENTE DESENVOLVIDAS NO LEER

*Cibele B. Zamboni¹, Sabrina Metairon¹, Dalton
N. S. Giovanni¹, Jose A. G. de Medeiros²*

¹Centro do Reator de Pesquisas – IPEN-CNEN/SP
Av. Professor Lineu Prestes 2242
05508-000 São Paulo – SP
czamboni@ipen.br

²Universidade Cidade de São Paulo – UNICID
Rua Cesário Galeno, 448/475
03071-000 São Paulo – SP

RESUMO

O Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER) realiza pesquisas em Física Aplicada na área da saúde, nutrição, meio ambiente e correlatas utilizando técnicas nucleares e atômicas. As investigações são realizadas utilizando as técnicas de Espectroscopia e Espectrometria de raios gama, Ativação Neutrônica e Fluorescência de Raios-X. O LEER atua também na área de Ensino

em Física, na implementação de métodos didáticos e na divulgação científica da física das radiações. Estas atividades envolvem estudantes de todos os níveis, de Iniciação Científica ao Doutorado, bem como Pós – doutorando e Cooperações de âmbito Nacional e Internacional com Instituições de referência (IF-USP, IBu, Unisa, UFF, Unifesp, HU-USP, Unicid, Unicamp, UNSL/San Luis-Argentina e Udelar/Montevideo-Uruguay). O programa de atividades estabelecido no LEER caracteriza-se pela interação entre as diferentes áreas da ciência que atuam no âmbito da saúde e meio ambiente, incluindo: Elaboração de propostas tecnológicas para a melhoria da qualidade vida de populações carentes e desprovidas de atendimento médico; Caracterização multielementar de novos medicamentos, vacinas e soros (antivenenos); Elaboração de propostas que possam suprimir/minimizar ou agregar melhorias no uso de modelos animais; Estudo das alterações ecológicas e os processos ambientalmente danosos relacionando-os ao ecossistema que incorporem as dimensões físicas, químicas e toxicológicas. Esses temas compõem monografias, dissertações e teses contribuindo para formação recursos.

1. INTRODUÇÃO

O Laboratório de Espectroscopia e Espectrometria das Radiações (LEER), desde sua implantação em 2005, atua na área da saúde pública em várias vertentes. Essas pesquisas envolvem o uso de técnicas analíticas para o desenvolvimento de procedimentos alternativos que auxiliam a caracterização de patologias diversas e monitoramento de tratamentos. Várias disfunções podem ser monitoradas por meio da avaliação da variação da concentração específica de íons em fluidos corporais. O *know-how* desenvolvido, visando ao emprego de nêutrons para realização desses exames clínicos (dosagem de íons), permite seu uso em diversas áreas, como: Anatomia Patológica, Patologia Clínica e Hematologia atuando como ferramenta para pré-diagnóstico.

Nos últimos anos, a técnica de Análise por Ativação com Nêutrons (AAN) tem sido empregada no LEER na realização de análises bioquímicas, em humanos e animais de experimentação, com um diferencial importante: o uso de sangue total. Em decorrência, este procedimento clínico alternativo agrega simplificações e vantagens, comparativamente aos procedimentos usuais (elaborados com soro [1]), a saber:

- utilização de sangue total (clínica convencional utiliza, principalmente, soro e plasma) o que dispensa o uso de anticoagulantes excluindo, portanto, a

- necessidade de separação soro – sangue o que reduz significativamente a quantidade de sangue a ser coletada (gotas);
- facilidades na realização dos testes bioquímicos quando a quantidade de amostras é escassa;
 - determinação simultânea da concentração de vários íons de relevância clínica e nutricional, o que não é possível pelos procedimentos clínicos convencionais (requerem no mínimo 0,1 ml soro ou plasma por análise de íon);
 - viabilidade de seu emprego em análises de demais fluidos corpóreos (soro, urina e saliva);
 - precisão analítica para análise quantitativa de amostras e facilidade de manejo;
 - procedimento não destrutivo: a amostra pode ser reavaliada sempre que requerido;
 - armazenamento sem a necessidade de refrigeração;
 - redução do rejeito hospitalar, pois elimina-se uso de vidraria, reagentes e anticoagulante, o que também minimiza os interferentes pré-analíticos (transporte, centrifugação, armazenamento).

Fazendo uso desta alternativa, o LEER atua, prioritariamente, em duas temáticas: prática clínica para uso em medicina de pré-diagnóstico e na medicina veterinária na realização de testes *in vivo* de modelo animal.

1.1 Prática Clínica

A utilização da técnica de AAN na análise de fluidos corpóreos auxilia pesquisas na área da saúde, tanto no entendimento como no diagnóstico de patologias diversas, além de beneficiar áreas correlatas como: clínica pediátrica, medicina esportiva e odontológica, nutrição, imunologia, genética, dentre outras. São vários os resultados já obtidos; uma síntese é apresentada a seguir.

Uso na medicina laboratorial com o objetivo de propor maior eficiência e rapidez no pre-diagnóstico de disfunções de alta prevalência na população brasileira, caso da anemia ferropriva e hemocromatose, com foco na dosagem de ferro em sangue total [2].

Uso na clínica pediátrica para agregar benefícios à prática clínica realizada em crianças, principalmente as prematuras e recém-nascidos. A dimensão deste problema na clínica pediátrica pode ser avaliada quando se considera que um recém-nascido de 3 kg tem entre 280 ml a 300 ml de sangue, enquanto um

premature de ~1kg tem da ordem de 180 a 200 ml de sangue. Em decorrência, as coletas de sangue para exames laboratoriais e funcionais na prática pediátrica são as principais causas das transfusões em crianças prematuras pois, dependendo da disfunção ou tratamento a criança pode necessitar de duas a três coletas por dia (~9,2% dos nascimentos no Brasil são prematuros). Portanto, o estabelecimento de métodos alternativos, como o emprego da técnica de AAN, focando principalmente o uso de pequena quantidade de sangue, contribui com ações para humanizar o atendimento de saúde dos neonatos garantindo precisão diagnóstica com o mínimo sofrimento e exposição a riscos [3].

Uso na medicina esportiva com foco na avaliação de atletas submetidos à atividade física intensa e/ou de longa duração, dada a necessidade desses exames clínicos serem realizados com frequência semanal e, por vezes, durante o a realização do treino diário. Essas análises sanguíneas podem ser utilizadas como avaliação complementar do status clínico de atletas bem como para a proposição de novos protocolos de avaliação, ainda não descritos na literatura [4-7].

Uso em pacientes com disfunção renal. Esta alternativa atende também a avaliação clínica de pacientes que necessitam de tratamento dialítico. De acordo com o último Censo Brasileiro de Nefrologia, mais de 120 mil pacientes estão em diálise no país. Atualmente, mais de 750 unidades atendem pacientes com problemas renais, o que requer vários exames bioquímicos em soro (antes e após a diálise) ou seja, coletas sucessivas de sangue, principalmente para pacientes que realizam diálises várias vezes por semana. As análises em sangue total realizadas pelo procedimento de AAN podem minimizar a quantidade de material biológico coletado bem como simplificar os procedimentos laboratoriais [8].

Uso na odontologia com foco na saúde bucal. Nos últimos anos, o uso da saliva como um fluido de diagnóstico tem aumentado. A principal vantagem para utilização de saliva em diagnósticos específicos é o acesso fácil e a simplicidade na coleta (não-invasivo). As análises em saliva utilizando a técnica de AAN disponibilizam indicadores de normalidade para população para que se possa estimular, a curto/médio prazo, seu uso em avaliação de disfunções diversas de alta prevalência, caso da disfunção periodontal e halitose [9-11].

1.2 Medicina Veterinária

Em 2012 com a criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA), pelo governo federal, com foco em apoiar estudos realizados com métodos alternativos que possam suprimir ou minimizar o uso de modelos animais, bem como oferecer alternativas que possam agregar melhorias em seu uso, que atendam as

demandas das boas práticas de laboratório (BPL), a técnica de AAN tem sido empregada para a realização de teste pré-clínicos de novos medicamentos, vacinas e outros insumos médicos, que envolvem testes *in vivo*, em modelo animal de pequeno porte.

Nos últimos anos, o LEER tem investido na implantação e padronização de protocolos e procedimentos para testes pré-clínicos *in-vivo* de modelos animal de experimentação de pequeno porte, em fluidos corpóreos (sangue total, soro e urina) para estimativa de íons de relevância clínica utilizando metodologia nuclear de AAN, agregando facilidades a essas análises laboratoriais. Essas medidas são realizadas em parceria com a Universidade Santo Amaro (Unisa/SP), Instituto Butantan (IBu/SP), Unifesp e o Centro do Genoma Humano (USP/SP). Um exemplo bastante produtivo é identificado na parceria com o IBu, cujo o objetivo é a adoção de ensaios *in-vivo* pelos métodos alternativos desenvolvidos no LEER, e aplicados com sucesso no desenvolvimento de soros e vacinas bem como na etapa de controle de qualidade desses insumos. Com a aplicação da técnica AAN elimina-se a etapa de sacrifício (caso dos camundongos e ratos) devido à pouca disponibilidade sanguínea (~1,0 a 2,0 ml e ~ 5,4 a 6,0 ml, respectivamente). Este procedimento contribui também na caracterização de materiais biológicos raros e de difícil obtenção, como o caso da produção de antivenenos de animais peçonhentos como lagartas, cobras e carrapatos [12-18]. Em complemento, este procedimento alternativo é empregado para investigar outras amostras biológicas que fornecem dados em áreas correlatas, como: Toxicologia, Imunologia, Genética, dentre outras.

2. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A coleta de sangue (50µl), pode ser feita por punção digital e ou venosa, o que elimina o procedimento de separação do soro – plasma bem como o uso de anticoagulante e reagentes. O procedimento para o preparo da amostra reduz-se a depositar o sangue em papel de filtro (Whatman – nº 41) imediatamente após a coleta. Para os exames laboratoriais na clínica pediátrica, a coleta de sangue é feita por punção digital (pelo teste do pezinho em recém- nascidos, utilizando a quarta gota).

No caso do preparo da amostra de soro, o sangue é coletado por punção venosa (~1 ml) em tubo seco e centrifugado para separação do soro (sem a adição de anticoagulantes ou reagentes) e preparo da amostra segue o mesmo procedimento descrito para o sangue total.

No caso de preparo de amostras de saliva, o doador realiza uma prévia lavagem com água destilada. A coleta (~1 ml) é espontânea e sem estimulação, diretamente em recipientes de plástico esterilizados e seu preparo segue o mesmo procedimento descrito para o sangue/soro.

Desta forma, a amostra biológica (sangue total/soro/saliva) não necessita de armazenamento especial, nem refrigeração podendo ser guardada por longos períodos (anos), pois só depende da durabilidade do papel.

Para os testes *in vivo*, em função do modelo animal, tem-se o ponto de coleta de sangue diferenciado (via ocular, por punção via jugular etc.) e posterior depósito em papel de filtro.

Essas análises são realizadas utilizando o método instrumental de ativação, no qual a amostra e padrão (material de referência certificado) são irradiados simultaneamente, garantindo as mesmas condições. As amostras são irradiadas no reator IEA-R1 do IPEN e a avaliação dos resultados é realizada pela análise de padrões certificados bem como pela análise comparativa dos resultados obtidos pela técnica de AAN com outro método analítico, a técnica de Fluorescência de Raios-X.

A instrumentação nuclear utilizada na aquisição dos espectros em energia da radiação- γ constitui-se de um espectrômetro- γ com detector semicondutor de Germânio hiper-puro de 198cm³ associado a um multicanal ADCAM (ORTEC-918-A), controlado por um microcomputador. As medidas de raios-X são realizadas utilizando o espectrômetro X-123 SDD (Amptek®), com alvos de Ag e Au, e detector semicondutor de Silício do tipo “Silicon Drift” (25 mm² x 500 μ m) com janela de Be (0,5 mil). A análise dos espectros de radiação gama e raios-X é realizada utilizando os programas fornecidos pelos fabricantes, bem como softwares desenvolvidos pelo LEER.

Estas investigações resultaram em diversos produtos tecnológicos aplicáveis a área de saúde e correlatas:

1. desenvolvimento de Processo em Prática Clínica para execução de análises bioquímicas em amostras de sangue total, soro e saliva;
2. elaboração de novos Protocolos Clínicos e Nutricionais em Medicina Esportiva;
3. processo alternativo para testes pré-clínicos (*in vivo*) de insumos médicos.

Estudos das alterações ecológicas e os processos ambientalmente danosos relacionando ao ecossistema, são também investigados pela técnica AAN.

Essas investigações incluem medidas de amostras solos, sedimentos e agentes transmissores de doenças (como algas e insetos) incorporando as dimensões físicas, químicas e toxicológicas [19-21].

3. CONCLUSÕES

Análises multielementares, que podem ser realizadas fazendo uso da técnica Análise por Ativação com Nêutrons, são de grande eficiência em investigações de sistemas biológicos devido sua simplicidade e precisão, uma vez que fornecem uma avaliação entre as interações metabólicas existentes entre os macro e microelementos no organismo. No âmbito da contribuição das análises ambientais fornecem dados que podem ser gerar conhecimento científico de processos e mecanismos que possibilitem dimensionar efeitos interferentes/poluentes auxiliando a promoção de programas de conservação.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos órgãos de fomento, Fapesp, CNPq e Capes pelo apoio financeiro, as equipes na área da saúde (bancos de sangue, hospitais e bio-térios) que auxiliam na coleta das amostras biológicas, bem como aos voluntários/doadores de amostras biológicas (doadores de sangue, atletas e pacientes).

REFERÊNCIAS

1. HENRY, J. B. *Diagnósticos clínicos e conduta terapêutica por exames laboratoriais*. Barueri: Manole, 2012.
2. ZAMBONI, C. B.; AZEVEDO, M. R.; METAIRON, S. Raios-X para dosagem de ferro em sangue. Riga, Letônia: Novas Edições Acadêmicas, Brasil, 2018. 60 p. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/handle/123456789/29440>.
3. ZAMBONI, C. B. *et al.* Detection of ions by XRF for use in the neonatal clinic. *In: XLI BRAZILIAN MEETING ON NUCLEAR PHYSICS*, 2-6 set. 2018, Maresias – São Sebastião. *Abstract [...]*. São Paulo: Sociedade Brasileira de Física, 2018. Disponível em: <http://repositorio.ipen.br/handle/123456789/30115>.
4. ZAMBONI, C. B. *et al.* Blood elements concentration in cyclists investigated by instrumental neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 309, p. 45-51, 2016.
5. KOVACS, L. *et al.* Sulfur status in long distance runners. *J. Phys. Conf. Ser.*, v. 630, p. 012009, 2015.
6. ZAMBONI, C. B. *et al.* Determination of Fe in blood using portable X-ray fluorescence spectrometry: an alternative for sports medicine. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 306, p. 1-3, 2015.
7. KOVACS, L. *et al.* Concentration of Ca in blood of amateur runners using NAA. *In: XXXV BRAZILIAN WORKSHOP ON NUCLEAR PHYSICS*, 2-6 set. 2012, Maresias–São Sebastião–

- SP. *Proceedings* [...]. São Paulo, 2013. v. 1529, p. 76-78. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4804088>.
8. METAIRON, S. *et al.* Analysis of elements in human blood of patients with chronic kidney disease using neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 282, p. 81-84, 2009.
9. MEDEIROS, J. A. G. *et al.* Investigation of Fe and Ca in non-stimulated human saliva using NAA. *J. Phys. Conf. Ser.*, v. 630, p. 012006, p. 2015.
10. LEWGOY, H. R. *et al.* Quantitative study of non-stimulated human whole saliva using NAA. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 296, p. 573-577, 2012.
11. ZAMBONI, C. B. *et al.* Investigation of saliva of patients with periodontal disease using NAA. In: XXXV BRAZILIAN WORKSHOP ON NUCLEAR PHYSICS, 2-6 set. 2012, Maresias–São Sebastião–SP. *Proceedings* [...]. São Paulo, 2013. v. 1529, p. 70- 72. DOI: <https://doi.org/10.1063/1.4804086>.
12. METAIRON, S. *et al.* Evaluation of ions and metals in the blood of GRMD dogs submitted to hASCs therapy by NAA and XRF techniques. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 143, p. 107-112, 2019.
13. REDÍGOLO, M. M. *et al.* Comparative study of inorganic elements determined in whole blood from Dmdmdx/J mice strain by EDXRF and NAA analytical techniques. *Appl. Radiat. Isot.*, v. 110, p. 189-192, 2016.
14. BAHOVSKI, V. *et al.* Differences in iron concentration in whole blood of animal models using NAA. *J. Phys. Conf. Ser.*, v. 630, p. 012004, 2015.
15. METAIRON, S. *et al.* Elemental analysis of biological tissues of animal models in muscular dystrophies investigation. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 291, p. 373-378, 2012.
16. OLIVEIRA, D. G. L. *et al.* Analysis of saliva from *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) species from Brazil by NAA. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 291, p. 385-388, 2012.
17. ZAMBONI, C. B. *et al.* Multielemental analyses of *Lonomia blique* (Lepidoptera, Saturniidae) caterpillar using EDXRF and INAA techniques. *X-Ray Spectrom.*, v. 1, p. 1- 11, 2019.
18. METAIRON, S. *et al.* Inorganic elements in blood of mice immunized with snake venom using NAA and XRF techniques. *J Radioanal Nucl Chem*, v. 309, p. 59-64, 2016.
19. CID, A. S. *et al.* Temporal evolution of $^{137}\text{Cs}^+$, K^+ and Na^+ in fruits of South American tropical species. *Sci. Total Environ.*, v. 444, p.115-112, 2013.
20. VELASCO, H. *et al.* Variability of ^{137}Cs and ^{40}K soil-to-fruit transfer factor in tropical lemon trees during the fruit development period. *J. Environ. Radioact.*, v. 104, p. 64-70, 2012.
21. ZAMBONI, C. B.; SILVEIRA, M. G.; MEDINA, N. H. Soil analysis using the semi-parametric NAA technique. *AIP*, v. 947, p. 493-494, 2007.