

II – Conceitos básicos

II.1 – O fígado: anatomia fisiológica e funcional

O fígado é o maior órgão interno do corpo humano e um dos mais importantes. Apelidado de “fábrica química” do organismo, regula os níveis das principais substâncias químicas do sangue. Situa-se na parte superior direita da cavidade abdominal conforme ilustra a **figura II.1**, com peso variando entre 1,2 e 1,6 kg. Fisiologicamente, seu volume está dividido em 2 lóbulos (direito e esquerdo) e cada lóbulo está dividido em 8 segmentos, sendo o lóbulo direito o maior deles, representando 5/6 de todo o órgão. A **figura II.2** mostra o perfil da superfície parietal do fígado, bem como suas divisões. Esse órgão tem uma geometria irregular e sua forma varia de uma pessoa para outra, conforme ilustra a **figura II.3**.

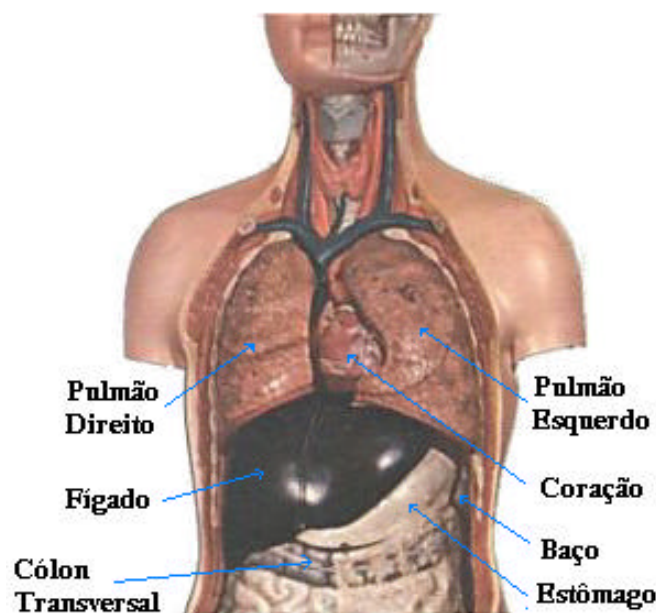


Figura II.1: Detalhes anatômicos do posicionamento do fígado e órgãos vizinhos

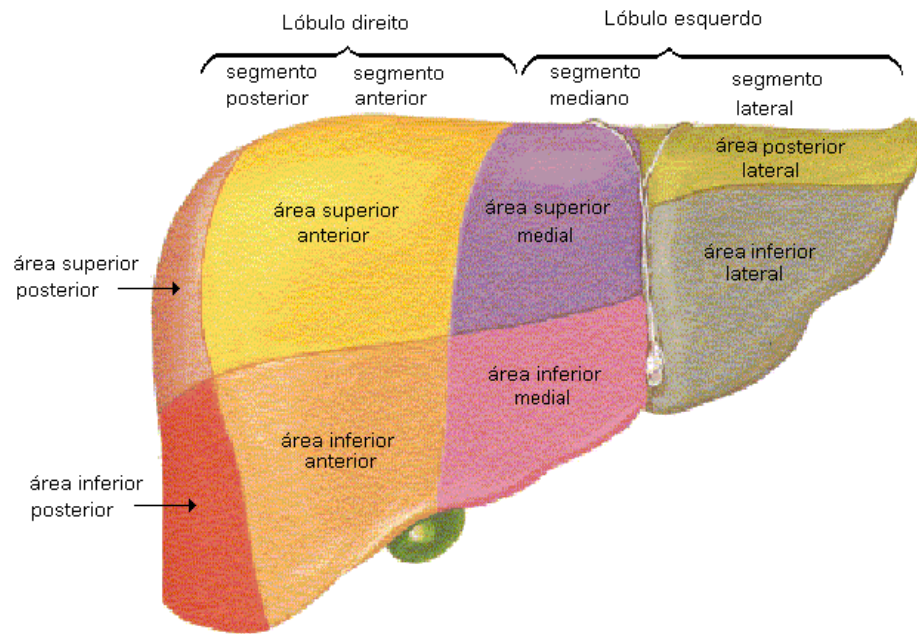


Figura II.2: Perfil da superfície parietal do fígado e das divisões fisiológicas. Figura modificada da referência (Netter, 1995)

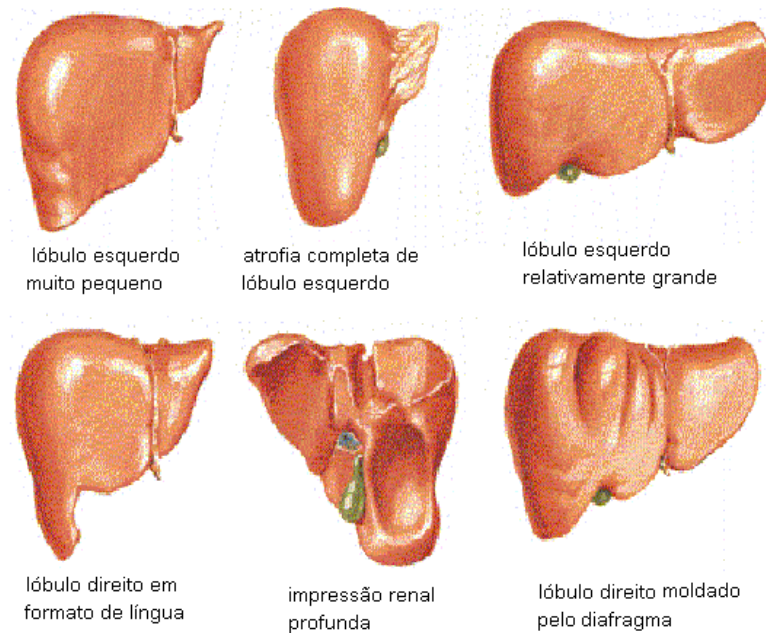


Figura II.3: Diferentes formas geométricas do fígado humano. Figura modificada da referência (Netter, 1995)

Todo o sangue que retorna do trato gastrointestinal para o coração passa através do fígado. Isso implica que tudo o que é ingerido e levado para a corrente sanguínea passa por ele também.

O fígado é parte vital do sistema digestivo, ajudando no desempenho de importantes funções biológicas, tais como:

- limpar o sangue através da metabolização de substâncias químicas, como o álcool, entre várias outras drogas, e neutralizar e destruir substâncias tóxicas ao organismo;
- regular e fornecer combustível ao corpo através da produção, armazenamento e fornecimento de energia (glicose), deixando a mente alerta e ativa;
- produzir proteínas envolvidas no transporte de substâncias através do sangue, no coágulo do sangue e na resistência às infecções; produzir a bÍlis, que elimina substâncias tóxicas do corpo e ajuda na digestão;
- regular o balanceamento de alguns hormônios como aqueles ligados ao sexo, à tireóide e à cortisona, entre outros;
- regular a produção, extração e conversão do colesterol em outras substâncias essenciais ao organismo;
- regular o armazenamento de reservas de ferro, bem como de uma variedade de vitaminas e de outros minerais;

Diante de sua variedade funcional, o número de anomalias hepáticas também é muito grande e atinge pessoas de várias idades. Já foram identificados mais de cem diferentes tipos de doenças no fígado, sendo que as mais comuns são: hepatite, cirrose, petrificação e câncer. O armazenamento de ferro em excesso no fígado também tem sido um fator de risco que precisa de cuidados médicos (Canadian Liver Foundation, Faa *et al*, 1999; Niederau *et al*, 1996, Nielsen *et al*, 1995). A avaliação do nível de ferro depositado no tecido hepático, que representa o principal alvo deste trabalho, é de grande interesse clínico para o seu monitoramento em tratamentos com agentes quelantes.

II.2 – O ferro no corpo humano

O ferro que circula pelo corpo pode ser absorvido naturalmente através da alimentação ou de transfusões de sangue (Bridges KR, 1998).

O ferro ingerido através dos alimentos geralmente está no estado ferroso (Fe^{+2}). Em contato com o ácido gástrico no estômago, ele é rapidamente oxidado, passando para o estado férrico (Fe^{+3}) sem liberar nenhum material. Neste último estado, ele é mantido insalubre pela acidez e por agentes, como o ascorbato, para depois ser absorvido pelas células da mucosa intestinal na região do duodeno e na região proximal do jejuno. Esse ferro absorvido é acoplado à transferina na circulação sanguínea e transportado para outras células do corpo. Quando a produção de ácido gástrico é debilitada, parte do ferro pode não passar para o seu estado férrico e conseqüentemente a absorção do ferro será reduzida. Além disso, o ferro, no seu estado ferroso (Fe^{+2}), é altamente tóxico devido à produção de radicais livres ao reagir com outras substâncias.

Aproximadamente 80% de todo o ferro presente no corpo está incorporado à hemoglobina nas células vermelhas ou hemácias. Um adulto produz em média 2×10^{11} células vermelhas diariamente, decorrentes de uma taxa de renovação de aproximadamente 0,8% das mesmas. Cada uma dessas células contém mais de um bilhão de átomos de ferro, sendo que cada 1 ml de células vermelhas contém aproximadamente 1 mg de ferro. Mas como o organismo necessita de uma absorção diária de aproximadamente 2×10^{20} átomos de ferro (20 mg), o complemento é absorvido pelo organismo através do processo de formação dos glóbulos vermelhos (eritropoese). Esse processo está diretamente relacionado com a taxa de absorção de ferro pelo sistema gastrointestinal, ou seja, quanto mais ferro for absorvido, mais glóbulos vermelhos poderão ser formados. Por sua vez, a alta taxa da eritropoese implica no aumento de ferro no plasma transportado pela transferina.

Aproximadamente 1 a 2 mg de ferro são absorvidos e excretados pelo corpo diariamente. Sua excreção se dá pela pele e pelas próprias células da mucosa do trato gastrointestinal. No corpo do homem adulto normal, o ferro total presente é da ordem de 4 g, sendo que aproximadamente 3 mg circulam pelo plasma acoplados à transferina. Conseqüentemente, uma pequena fração desse ferro é reutilizada pelo organismo, sendo esse quantitativamente mais importante para o organismo que aquele absorvido pelo trato

gastrointestinal. A **figura II.4** mostra um esquema simplificado do ciclo do ferro no corpo humano.

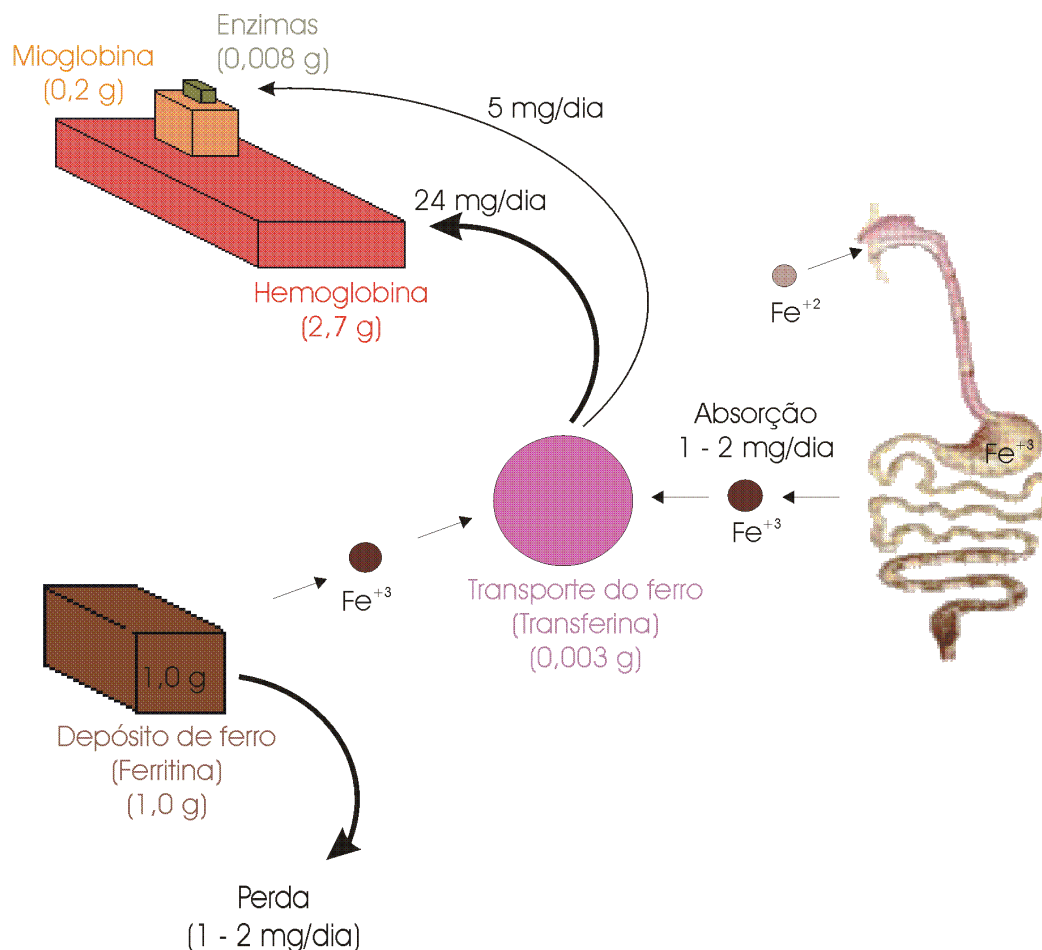


Figura II.4: Esquema simplificado do ciclo de ferro normal no corpo humano

A transferina plasmática é uma glicoproteína que tem domínios com N e C terminais, aos quais o ferro é ligado. Sob condições normais, um terço desses domínios é preenchido com Fe^{+3} . Ela é um quelante natural que, além de transportar o ferro intracelular, deixa-o fisiologicamente equilibrado e impede a produção de radicais livres.

Aproximadamente 80% do ferro ligado à transferina em circulação é transportado via medula óssea. O ferro hepático está presente nas células reticuloendoteliais e nos hepatócitos. As células reticuloendoteliais adquirem o ferro primariamente pela fagocitose e quebra das

células vermelhas. Estas células extraem o ferro da heme e o retornam para a circulação através da transferina.

A produção de células vermelhas envolve o funcionamento coordenado dos rins e da medula óssea. Nos primeiros são produzidos eritropoietina por hipoxia (baixo nível de oxigênio). Na medula óssea, esse hormônio circula através da corrente sanguínea, ativando nova produção de células vermelhas.

O ferro que não está em circulação encontra-se complexado pelas moléculas de ferritina (ftn) numa forma semicristalina. Essas moléculas são complexos heteropolímeros com 24 subunidades de proteínas H (para Heavy ou Heart) e L (para Light ou Liver). Essas subunidades de ferritina formam uma esfera com uma cavidade central, onde mais de 4.500 átomos de ferro são armazenados na forma de óxido de polifosfato de ferro (ver figura II.5).

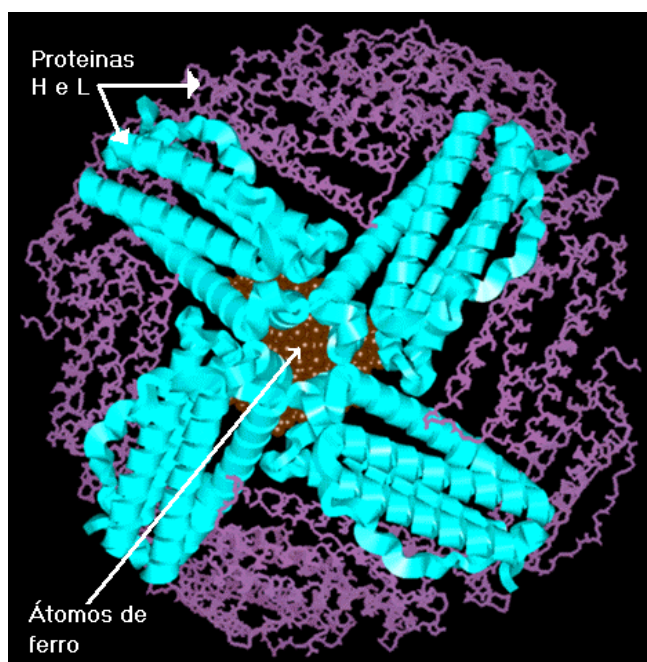


Figura II.5: Detalhes da molécula de ferritina. As subunidades L e H e os átomos de ferro aprisionados no centro da molécula. Figura modificada da referência (Casiday *et al*)

Embora as duas cadeias de ferritina sejam homólogas, apenas as ferritinas H têm atividade de ferroxidase, que é um mecanismo envolvendo o dioxigênio que converte o ferro do estado ferroso para o estado férrico, promovendo incorporação na molécula (Yang *et al* 1999). A ferritina presente no fígado e no baço é rica em subunidades L e a ferritina presente no coração é rica em subunidades H. O aumento desta última está relacionado com o aumento da utilização de ferro pelo organismo, enquanto que o aumento da subunidade L está correlacionado com o aumento do depósito de ferro, portanto a ferritina apresenta-se como uma flexível reserva de ferro no organismo.

As ferritinas são aglomeradas e engolfadas pelos lisossomos, provocando a sua degradação e produzindo a hemosiderina, que é um aglomerado amorfo de proteínas e lipídios ligado às moléculas de óxido de ferro.

O ferro depositado no organismo é muito importante para a produção de células vermelhas, sendo, portanto, de fundamental importância para a hemoglobina, na qual, 95% das células vermelhas estão presentes. Conforme já mencionado anteriormente, o ferro é parte essencial da dieta alimentar. Após ser absorvido pelo duodeno e pelo jejuno proximal, o metal é rapidamente ligado à transferina que o transporta para todas as células do corpo. O acoplamento do ferro à eritropoietina gera a produção de novas células vermelhas. Se um desses componentes estiver ausente, teremos a anemia. Em caso de pacientes com alta deficiência de ferro e que recebem esse metal por infusão intravenosa, a produção de células vermelhas aumenta. Para que isso ocorra, é preciso que esse paciente tenha alto nível de eritropoietina. Tal fenômeno de deficiência de ferro e alto nível de eritropoietina ocorre em pacientes que apresentam sangramento no trato gastrointestinal. O oposto, alto nível de ferro e baixo nível de eritropoietina, é muito comum em pacientes com deficiência renal crônica, o que requer a hemodiálise. Neste caso, o aumento do hematócrito é alcançado com tratamento de eritropoietina.

Quando o ferro que circula pelo corpo se apresenta em sobrecarga, a transferina, seu principal veículo de transporte é saturada, ou seja, todos os sítios de ligação são preenchidos com ferro. O excesso desse metal é transportado por outros quelantes, tais como: albumina, citrato, aminoácido e açúcar, que apresentam ligações fracas com o ferro. Esses átomos de ferro não ligados à transferina são depositados nos tecidos não hematopoéticos, particularmente o fígado, os órgãos endócrinos e, preferencialmente, o coração. É nessa fase de saturação que o ferro passa a ficar tóxico para o organismo (Fosburg MT *et al*, 1990).

O ferro tem seu papel importante na reação química que envolve o deslocamento de elétrons entre moléculas. Esse processo ocorre pela produção de energia gerada através de oxidação controlada de carboidratos, proteínas e lipídios. Por isso a importância de a troca de metal ser bem regulada no organismo. Quando o ferro é ligado a uma molécula quelante, seja ela sintética ou biológica, a reatividade do ferro no organismo é praticamente eliminada.

A capacidade de armazenamento de ferro na molécula de ferritina aumenta em pacientes que recebem múltiplas transfusões de sangue, como os que sofrem de anemia crônica. Nesse caso, o ferro livre não ligado à ferritina é acumulado nos tecidos e no sangue e o livre pode catalisar a formação de compostos que são prejudiciais ao organismo, como a formação do radical hidroxila (OH), a partir de compostos como o peróxido de hidrogênio. O radical hidroxila é altamente reativo e ataca lipídios, proteínas e DNA. A reação inicial com cada uma destas moléculas é a formação de peróxidos que podem interagir com outras moléculas.

Quando o fígado está sobrecarregado de ferro, os hepatócitos (células do fígado que mais armazenam ferro) são bombardeados por uma espécie de oxigênio reativo, que os leva à morte. Seu espaço é preenchido por células fibroblastos que armazenam colágeno, produzindo fibrose e, eventualmente, cirrose. Dessa mesma forma, as células cardíacas também são destruídas pela sobrecarga de ferro, levando a graves anomalias no funcionamento do coração, como as arritmias. Geralmente, alguns pacientes talassêmicos sob terapia transfusional de sangue apresentam aumento do volume do baço. Em muitos desses casos, principalmente os que recebem inúmeras transfusões têm esse órgão removido (Fosburg MT *et al*, 1999).

II.2.1 – Causa da sobrecarga de ferro

A sobrecarga de ferro sobre todo o corpo ocorre mais frequentemente devido à hemocromatose hereditária ou a repetidas transfusões de sangue em pacientes com anemia crônica, sendo a primeira a mais comum das duas.

A hemocromatose hereditária é consequência da absorção de ferro da alimentação diária. Geralmente, as consequências desse acúmulo de ferro surgem entre os 30 e os 40 anos e o gene responsável pela hemocromatose, HFE, reside no cromossomo 6.

Num ciclo normal do transporte de ferro pelo organismo, a proteína transferina acopla-se ao ferro, deixando-o num estado não tóxico e transportando-o pela corrente sanguínea. Os receptores da transferina ligam-se ao complexo ferro-transferina e o levam para o endossomo. Lá o ferro é separado da transferina e aprisionado no interior da célula. A transferina, livre do ferro, retorna para a circulação pronta para fazer o seu papel de transportar o ferro. Em pessoas portadoras do gene HFE, esse ciclo é perturbado porque a proteína associada com o receptor, a transferina, previne o aprisionamento do complexo ferro-transferina dentro do endossomo.

Os tipos mais comuns de anemias crônicas, que necessitam de transfusões de sangue, são a anemia falciforme e a talassemia beta ou talassemia maior.

A anemia falciforme é uma doença hereditária, cuja principal característica é a deformidade nos glóbulos vermelhos, os quais mudam da forma normal arredondada para a forma de foice - origem do nome falciforme. Acomete principalmente a população negra, já que deriva de uma mutação genética que ocorreu há milhares de anos no continente africano. Essa alteração morfológica faz com que os glóbulos vermelhos sejam destruídos precocemente, causando anemia grave. As células falciformes têm pouca mobilidade e flexibilidade e podem agrupar-se umas sobre as outras, causando oclusão no sistema circulatório. Com isso, o suprimento de oxigênio para todo o organismo é prejudicado. Há comprometimento progressivo de todos os órgãos, resultando em microinfartos locais, com crises dolorosas que acometem principalmente os sistemas muscular e esquelético. As dores variam de intensidade - de moderadas a fortes -, podendo durar horas ou dias.

A talassemia representa um grupo variado de doenças genéticas do sangue e é caracterizada pela ausência ou redução da produção de hemoglobinas normais. A talassemia beta é a mais severa delas e está relacionada com a ausência da globina beta, resultando em um excesso de globina alfa, que se acumula nos eritroblastos e provoca alterações na eritropoiese e na maturação das células, dentre outras.

A sobrecarga de ferro devido a transfusões de sangue é proveniente do ferro presente nas células vermelhas. Por exemplo: cada unidade de células vermelhas usada nas transfusões contém em média 200-250 mg de ferro; no entanto, se os pacientes submetidos a transfusões de sangue receberem em média 2 unidades por mês, acumularão um excesso de ferro no organismo de aproximadamente 5-6 g por ano. Se esse excesso não for tratado, danos nos órgãos em que ele é acumulado geralmente começarão a surgir em pacientes que já tenham

recebido em média 100 unidades de transfusões ou 20 gramas de excesso de ferro. A terapia por transfusão é extremamente necessária para manter circulando um nível de hemoglobina suficiente para suprir a eritropoiese, prevenindo assim os riscos provenientes de uma anemia elevada.

O que diferencia a sobrecarga de ferro devido à hemocromatose da sobrecarga devido a transfusões de sangue é o grande depósito de ferro presente nas células reticuloendoteliais. No caso da hemacromatose, o depósito de ferro se faz direto da transferina para os tecidos. Já no caso das transfusões, o excesso de ferro ocorre tanto nas células reticuloendoteliais quanto nos parênquimas (Bridges, 1999).

II.2.2 – Remoção do excesso de ferro

Conforme já foi mencionado, o excesso de ferro no corpo humano, proveniente de inúmeras transfusões de sangue, é removido através da terapia com agentes quelantes, (pequenas moléculas que se ligam a íons metálicos). Esse tratamento tem por objetivo manter em circulação um nível de hemoglobina suficiente para suprir a eritropoiese. Sua eficiência depende da relação entre a taxa de redução do ferro, com o uso do quelante, e a taxa de deposição de ferro no organismo. Os casos mais demorados de tratamento são: 1) em pacientes submetidos a transplante de medula óssea, o que requer muitas transfusões até que a função da nova medula seja estabilizada; 2) em pacientes submetidos a transfusões indefinidamente. Geralmente, o início do tratamento é indicado após transfusões de 50 unidades de sangue ou quando a ferritina no soro sanguíneo excede 500 ng/ml. Esse acúmulo de ferro corresponde a aproximadamente 1-2 anos de tratamento. Em pessoas normais, o nível de ferritina no plasma varia entre 40 e 160 ng/ml.

Uma das principais propriedades do quelante é que o ferro ligado a ele é quimicamente inerte no organismo. Os quelantes mais usados em tratamento clínico são o EDTA (Ethilene Diamine Tetra Acid) e o desferreoxamine (Desferal[®]). O primeiro é usado no tratamento de pacientes com hipercalcemia (quantidade elevada de cálcio no sangue). O segundo é usado para remover excesso de ferro acumulado com transfusões de sangue (MEDIC, 1994; Oliveri, *et al*, 1995; Nielsen *et al* 1995).

Algumas das principais propriedades que classificam os quelantes para aplicações clínicas específicas são:

- sua origem: se as moléculas são produzidas biológica ou sinteticamente;
- sua interação com solventes: se hidrofóbica ou hidrofílica;
- sua interação estequiométrica: se bidentate ou hexadentate.

O Desferal – droga mais usada na terapia de quelação – é fracamente absorvido pelo trato gastrointestinal, por isso ela é aplicada por infusão intravenosa e/ou subcutânea. A administração da terapia de quelação usando-se drogas como a deferoxamina é um procedimento de custo elevado, além de desconfortável para o paciente. Por essas razões, pesquisadores do mundo inteiro investigam quelantes de ferro que possam ser administrados oralmente. Esse desconforto e o elevado preço levam muitos pacientes a desistir do tratamento (Oliveri *et al*, 1995; Faa *et al*, 1999).

A neutralização do ferro no organismo através da molécula quelante pode ocorrer total ou parcialmente. O íon de ferro tem seis sítios de coordenação eletroquímica. As moléculas que se ligam a esses sítios do ferro tornam-se totalmente inativas. Esse quelante é denominado hexadentato, como é o caso da desferreoxamina. Por outro lado, os quelantes que se ligam a apenas dois sítios do íon de ferro são denominados bidentatos, como é o caso do ferricromo . Este segundo tipo de ligação pode produzir reações parciais com o ferro (Bridges, 1999).

De acordo com a literatura, um quelante ideal para a aplicação clínica precisaria ter as seguintes características:

1. ser de uso oral;
2. apresentar boa penetração no tecido;
3. ter fácil mobilização após ligar-se ao ferro;
4. ter baixo custo;
5. não ser tóxico ao organismo;
6. apresentar ligação hexadentate ao íon de ferro.

A terapia em pacientes com hemocromatose para a redução do excesso de ferro no corpo consiste de repetidas remoções de um percentual de sangue (Niderau *et al*, 1996).

II.3 – Métodos de análises do nível de ferro no corpo humano.

O monitoramento acurado do nível de ferro depositado nos tecidos ou nos órgãos de portadores de hemocromatose ou de anemia crônica, que estão sendo submetidos a transfusões de sangue, é de fundamental importância para a eficácia do tratamento clínico, principalmente de pacientes que estão sob terapia por quelação. Existem várias técnicas com tal proposta, mas nenhuma delas atinge as exigências necessárias para a avaliação de determinadas anomalias, causadas por sobrecarga de ferro no organismo.

Os métodos rotineiramente usados para avaliar o nível de ferro no corpo humano, na maioria dos centros clínicos, são: medida da concentração de ferro ou da proteína ferritina no plasma e medida da concentração de ferro hepático, por análises químicas e/ou espectroscópicas, em amostras de biópsias hepáticas. Outros métodos não invasivos e inócuos, que estão sendo fortemente explorados devido a seus grandes potenciais para tal análise, são a susceptometria magnética do fígado e a imagem por ressonância magnética, conforme já foram mencionados anteriormente.

II.3.1 – Concentração da proteína ferritina e/ou ferro ligado à proteína no plasma

Embora a função fisiológica da pequena quantidade de ferritina que circula pelo plasma não seja ainda bem conhecida, em pessoas normais ela se apresenta proporcional ao depósito total de ferritina presente no corpo humano. Na ausência de complicadores, a concentração de ferritina no plasma diminui com a redução do depósito de ferro e aumenta com o acúmulo deste. Mas uma variedade de fatores, tais como deficiência de ácido ascorbato, inflamações crônicas e agudas e aumento de eritropoietina, entre outros, pode alterar totalmente essa relação entre o nível de ferritina no plasma e o depósito de ferro em todo o corpo (Fosburg *et al*, 1990; Brittenham *et al*, 1993). Estudos têm indicado que, em pacientes com concentração de ferritina no plasma maior do que 4,000 µg/L, a correlação entre a proteína ferritina no soro e o depósito de ferro pode ser fortemente alterada pelos fatores acima mencionados. Analisando pacientes com anemia falciforme, que estavam sendo submetidos a transfusões de sangue, Brittenham *et al* (2001) observaram que o nível de ferro no tecido hepático corresponde aproximadamente a 57% da quantidade avaliada pela medida da

ferritina no plasma. Além disso, a dispersão dessa última medida foi muito grande, quando comparada com medida realizada através da susceptometria magnética.

Similarmente à medida da concentração de proteína no plasma, a medida do nível de ferro ligado à proteína tem sido usada como uma ferramenta alternativa de estimar o depósito de ferro no corpo humano. Esse método de medida é importante para diferenciar as mudanças do nível de ferro na ferritina alterada por doenças hepáticas, pois a proteína ferritina no plasma, produzida nessa fase aguda, contém menos ferro do que o esperado. Recentes estudos mostram que o nível de ferro na ferritina no plasma correlaciona-se com o depósito de ferro no corpo, de forma similar ao nível da proteína ferritina (Nielsen *et al*, 2000).

Embora não apresente boa correlação com o verdadeiro nível de ferro no organismo, a medida da ferritina no plasma, e/ou do ferro ligado a ela, é o método mais usado por ser de mais fácil manuseio, mais disponível na maioria dos centros de saúde e o mais confortável até então. Sua medida é considerada por estar linearmente correlacionada com a quantidade de ferro no corpo, apenas para depósitos que variam entre 1 e 3 g. Ballas *et al* (2001) observaram que o nível de ferritina no soro sanguíneo, durante o tratamento terapêutico por transfusão, é maior do que quando no estado de equilíbrio. O oposto foi observado para o nível de ferro ligado à proteína ferritina no plasma e à capacidade total de ligação do ferro.

II.3.2 – Biópsia hepática por agulha

A biópsia por agulha é o método mais preciso para a quantificação de ferro hepático em pacientes com sobrecarga desse metal no corpo, sendo, portanto, usada como técnica-padrão. Ela consiste de uma análise direta, por método químico ou espectroscópico, sobre uma pequena amostra do tecido hepático (~0,5 mg). Essa amostra é removida diretamente do fígado, através de um processo microcirúrgico, com uma agulha longa. Além de avaliar a concentração de ferro depositada nos tecidos, ela também permite diagnosticar doenças que alteram o tecido hepático. No entanto, por ser um método invasivo e de risco, sua aplicação clínica torna-se limitada, não podendo ser usada para o acompanhamento de pacientes que estão sob tratamento por quelação.

II.3.3 – Susceptometria magnética

A susceptometria tem se apresentado como o método não invasivo mais confortável e mais preciso, pois sua medida é direta no volume hepático e apresenta uma boa linearidade com a técnica-padrão (biópsia da agulha), em níveis que variam de normal a altas sobrecargas, independentemente das condições fisiológicas do tecido hepático (Fischer *et al*, 1998; Brittenham *et al*, 1983). A grande desvantagem dessa técnica é que ela ainda tem um custo elevado, uma vez que sua tecnologia é muito sofisticada, fazendo uso de um sensor magnético supercondutor denominado SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) e, por enquanto, são poucos os centros de pesquisa que dispõem de um susceptômetro dessa natureza. Detalhes do funcionamento dessa técnica são apresentados no item II.6.

II.3.4 – Imagem por ressonância magnética

Esse método tem sido fortemente explorado, no intuito de alcançar um padrão de medida que seja confiável e possa ser aplicado em grande escala, pois, apesar de sua sensibilidade em determinar variações nos parâmetros de ressonância do próton, devido à presença do átomo de ferro, a quantificação das mesmas depende de ajustes bastante delicados nos diversos controles instrumentais, como: intensidade do campo de magnetização, seqüências das imagens (se spin-echo, gradiente-echo, etc), entre outros. Vários métodos de quantificação do ferro hepático *in vivo* com a ressonância magnética têm sido analisados para diferentes ajustes nos parâmetros acima mencionados (Baffa *et al*, 1986; Kaltwasser *et al*, 1990; Gomori *et al*, 1991; Thomsen *et al*, 1992; Engelhardt *et al*, 1994; Dixon *et al*, 1994; Papakonstantinou *et al*, 1999; Kreeftenberg *et al*, 2000; Clark *et al*, 2000). Contudo, até então, nenhum padrão de medida com o uso da técnica de imagens por ressonância magnética (MRI) tem sido adotado para aplicações clínicas. Uma grande vantagem desse método é que ele permite avaliar a concentração de ferro em regiões selecionadas do tecido hepático (Clark *et al*, 2000), mas o seu uso é limitado por não apresentar uma boa correlação com altas concentrações de ferro ($> 5 \text{ mg ftn/g}_{\text{tecido hepático}}$). Um outro fator negativo no uso de MRI é que sua resposta é diferenciada para tecidos hepáticos ricos em fibroses (Angelucci *et al*, 1997) – seqüela muito comum em pacientes com doenças hepáticas e que geralmente têm sobrecarga de ferro proveniente de várias transfusões de sangue. O uso de MRI, portanto, não é clinicamente indicado para o monitoramento de pacientes que tenham carga elevada de ferro

no fígado e que estejam sob tratamento com quelação. Por outro lado, para a quantificação de ferro hepático, a MRI pode ser aplicada com sucesso em pacientes com hemacromatose (Bonkovsky *et al*, 1999).

Outros métodos já explorados para avaliar o depósito de ferro no corpo humano foram: fluorescência de raio X da pele (Farquharson *et al*, 2000); espalhamento de raio X por Ressonância Nuclear (Wielopolski *et al*, 1992); tomografia computadorizada (Marchi *et al*, 1991), entre outros. Mas nenhum desses, porém, despertou grande interesse em aplicações clínicas devido à falta de sensibilidade, às dificuldades técnicas, ao caráter invasivo, ou a outras limitações.

II.4 – A interação do campo magnético com a matéria

Numa escala atômica, podemos observar que o caráter magnético dos materiais está relacionado com o movimento dos elétrons em torno do núcleo e do seu próprio eixo. Esses *loops* de correntes podem ser considerados como dipolos magnéticos. Estes, quando na presença de campo magnético externo, tendem a alinhar-se na mesma direção do campo, que os torna magneticamente polarizados ou magnetizados. Nos materiais denominados paramagnéticos e ferromagnéticos, esse alinhamento ocorre no mesmo sentido do campo externo e é caracterizado pelo alinhamento dos dipolos, associados aos elétrons livres, enquanto que, nos materiais denominados diamagnéticos, o alinhamento ocorre no sentido oposto e é caracterizado pelas mudanças do momento de dipolo orbital, devido às alterações da velocidade orbital dos elétrons na presença do campo externo

A magnetização nos materiais diamagnéticos e paramagnéticos é pequena e linear ao campo externo de baixa intensidade e é nula na ausência dele. Já os materiais ferromagnéticos são fortemente magnetizados e geralmente de forma não-linear, além de apresentar magnetização mesmo na ausência de campo externo, devido às interações entre os dipolos vizinhos (Griffiths DJ, 1999).

Materiais biológicos, tais como tecido, pele, gordura, osso, etc, são, em sua maioria, diamagnéticos. Alguns outros, como ar, ferro biológico, etc, são paramagnéticos. Como os materiais de estudo neste trabalho são de caráter biológico, ou seja, são fracamente

magnetizados, os conceitos físicos da interação do campo magnético com a matéria, apresentados a seguir, aplicam-se apenas a materiais que apresentam uma magnetização linear com o campo aplicado.

II.4.1 – A magnetização

Quando um material é exposto a um campo magnético de Intensidade \mathbf{H} , adquire uma magnetização \mathbf{M} . Essa polarização magnética é definida como sendo o momento de dipolo magnético \mathbf{m} por unidade de volume e representa a contribuição de todos os dipolos magnéticos presentes no material em estudo, ou seja,

$$\vec{M} = \lim_{\Delta V \rightarrow 0} \frac{1}{\Delta V} \sum_i \vec{m}(\vec{r}_i) \quad \text{II.1}$$

sendo $\vec{m}(\vec{r})$ o momento de dipolo magnético da molécula no elemento de volume \mathbf{DV} , localizado na posição \vec{r}_i .

Em materiais diamagnéticos e paramagnéticos, a magnetização \vec{M} é mantida pelo campo aplicado \vec{H} , ou seja, quando este é removido, a magnetização também desaparece. Esses materiais são denominados isotrópicos e a sua magnetização é proporcional ao campo magnético aplicado, ou seja:

$$\vec{M} = c \vec{H} \quad \text{II.2}$$

sendo que χ é a suscetibilidade magnética volumétrica do material e tem um valor muito pequeno ($|\chi| \ll 1$). Essa é uma grandeza adimensional, sendo positiva para os materiais paramagnéticos e negativa para os diamagnéticos. A água, por exemplo, principal constituinte do corpo humano, é diamagnética e tem suscetibilidade igual a $-9,032 \times 10^{-6}$ (S.I.), enquanto que o ar, substância muito presente na região pulmonar, é paramagnético e tem suscetibilidade igual a $0,36 \times 10^{-6}$ (S.I.)

A densidade de fluxo magnético \vec{B} , na presença de um meio material magnetizado, é representada por:

$$\vec{B} = \mu_0 (\vec{H} + \vec{M}) \quad \text{II.3}$$

sendo μ_0 a permeabilidade no vácuo.

Substituindo-se a equação II.2 na equação II.3, tem-se:

$$\begin{aligned} \vec{B} &= \mu_0 (1 + c_m) \vec{H} \\ \vec{B} &= \mu \vec{H} \end{aligned} \quad \text{II.4}$$

sendo $\mu = \mu_0 (1 + c_m)$ uma outra propriedade do material, denominada permeabilidade magnética (Sadiku, 1995).

É comum encontrarmos citada em tabelas a permeabilidade magnética adimensional μ_r , definida como sendo

$$\mu_r = \frac{\mu}{\mu_0} = (1 + c_m) \quad \text{II.5}$$

É comum também encontrarmos na literatura a suscetibilidade mássica (χ_{massa}) e a suscetibilidade molar (χ_{molar}), as quais apresentam as seguintes relações com a suscetibilidade volumétrica c :

$$\begin{aligned} c_{\text{massa}} &= \frac{c}{d} \\ c_{\text{molar}} &= \frac{c A}{d} \end{aligned} \quad \text{II.6}$$

sendo que d é a densidade do material e A é o peso molecular.

A **tabela II.1** apresenta os valores de suscetibilidade magnética de alguns materiais. Os valores adimensionais representam a suscetibilidade volumétrica

Material	$\chi_{\text{volume}} \text{ (S.I.) } (x10^{-6})$
Sangue Venoso	-7,8
Sangue arterial	-9,3
Pulmão	-4,2
Músculo	-9,03
Fígado	-8,26
Osso	-10,00
Gordura	-9,03
Células vermelhas oxigenadas	-9,03
Células vermelhas desoxigenadas	3,88
Ar	0,36
Água	9,032
Ferritina *	$1,6 \times c_{\text{ferr}}^*$

Tabela II.1: Valores estimados da suscetibilidade volumétrica dos principais constituintes do torso humano. (*) A suscetibilidade volumétrica da ferritina está apresentada pelo produto entre a sua suscetibilidade mássica ($\sim 1,6 \times 10^{-6} \text{ m}^3/\text{Kg}$) e a sua concentração distribuída no tecido, ou seja, massa de ferritina por volume de tecido. (Ribeiro EP, 1996).

II.4.2 – Suscetibilidade de um material composto de N diferentes moléculas.

Suponhamos um volume V preenchido com N diferentes materiais, distribuídos homogeneamente. De acordo com as equações II.1 e II.2, a suscetibilidade média desse composto será dada por

$$c = \frac{M}{H} = \frac{1}{H} \sum_i \frac{m(\vec{r}_i)}{V} \quad \text{II.7}$$

sendo que r_i é a posição da molécula i , com momento m presente no volume V . Sendo essas moléculas de N tipos diferentes, então pode-se representar a equação II.7 por:

$$\mathbf{c} = \frac{1}{H} \left[\sum_i \frac{m_1(\vec{r}_i)}{V} + \sum_i \frac{m_2(\vec{r}_i)}{V} + \dots + \sum_i \frac{m_N(\vec{r}_i)}{V} \right] \quad \text{II.8}$$

$$\mathbf{c} = \frac{1}{H} \sum_i \sum_j \frac{m_j(\vec{r}_i)}{V}$$

sendo m_j o momento de dipolo magnético do j -ésimo material, presente no volume V .

Inserindo-se $\frac{V_j d_j}{V_j d_j}$ no somatório da equação II.8 e fazendo-se uso das equações II.2 e

II.6, temos:

$$\mathbf{c} = \frac{1}{H} \sum_i \sum_j \frac{m_j(r_i)}{V} \frac{V_j d_j}{V_j d_j} = \frac{1}{H} \sum_i \sum_j \frac{m_j(r_i)}{V_j} \frac{\mathbf{a}_j}{V d_j}$$

$$\mathbf{c} = \sum_j \frac{M_j}{H} \frac{c_j}{d_j} = \sum_j \frac{\mathbf{c}_j}{d_j} c_j \quad \text{II.9}$$

$$\mathbf{c} = \sum_j c_j \mathbf{c}_{j, massa}$$

sendo que \mathbf{c}_j é a suscetibilidade magnética volumétrica, $\mathbf{c}_{j, massa}$ é a suscetibilidade magnética mássica, c_j é a concentração, V_j é o volume e \mathbf{a}_j é a massa do material j presente no volume V . Assim, a suscetibilidade magnética, resultante de várias substâncias misturadas homogeneamente, é igual à soma das suscetibilidades mássicas de cada uma, multiplicada pelas suas respectivas concentrações.

II.5 – Fluxo magnético sobre o sensor

O fluxo magnético sobre as bobinas de detecção devido à presença de um material magnetizado é dado por

$$d\Phi = \oint_a \vec{B} \cdot d\vec{a} \quad \text{II.10}$$

em que B é a densidade de fluxo magnético e a é a área da bobina de detecção.

Admitindo-se um volume infinitesimal do material, o campo induzido \mathbf{B} pode ser considerado como o campo de um dipolo magnético de momento \mathbf{m} e pode ser representado pelo rotacional do potencial vetor \mathbf{A} , ou seja:

$$\begin{aligned}\vec{A} &= \frac{\mathbf{m}_b}{4\pi} \frac{\vec{m} \times \vec{r}}{r^3} \\ \vec{B} &= \nabla \times \vec{A}\end{aligned}\quad \text{II.11}$$

sendo \vec{r} o vetor posição, centrado no dipolo e apontando para o centro da bobina de detecção.

Substituindo-se a equação II.11 na equação II.10 e aplicando-se o teorema de Stokes, temos:

$$d\Phi = \frac{\mathbf{m}_b}{4\pi} \oint_a \nabla \times \frac{\vec{m} \times \vec{r}}{r^3} \cdot d\vec{a} = \frac{\mathbf{m}_b}{4\pi} m \cdot \oint_c \frac{\vec{r} \times d\vec{l}}{r^3}\quad \text{II.12}$$

sendo que \vec{r} é o vetor posição, centrado no dipolo e apontando para o elemento $d\vec{l}$ da bobina. A integral passa a ser feita ao longo do perímetro da bobina.

De acordo com o teorema da reciprocidade, um campo magnético de mesma intensidade e na mesma posição do dipolo será produzido, se as bobinas de detecção forem energizadas por uma corrente I_r igual àquela induzida, devido à presença do dipolo. Podemos, portanto, usar esse artifício para simplificar os cálculos da integral II.12.

Pela lei de Bio-Savart, o campo magnético gerado por uma bobina alimentada por uma corrente I_r é

$$\vec{B}_r = \frac{I_r \mathbf{m}_b}{4\pi} \oint_c \frac{d\vec{l} \times \vec{r}'}{r'^3}\quad \text{II.13}$$

sendo B_r denominado campo recíproco.

Fazendo-se $\vec{r}' = -\vec{r}$ na equação II.13 e substituindo-se esta na equação II.12, temos:

$$d\Phi = \vec{m} \cdot \frac{\vec{B}_r}{I_r}\quad \text{II.14}$$

De acordo com as equações II.10, II.11 e II.13, temos que o momento de dipolo pode ser descrito como

$$\vec{m} = \vec{M} dV = c \vec{H}_e dV = \frac{c}{\mathbf{m}} \vec{B}_e dV \quad \text{II.15}$$

sendo H_e o campo aplicado e dV o elemento de volume com momento magnético m .

Considerando-se que $\chi \ll 1$ para materiais paramagnéticos e diamagnéticos, tem-se então que $\mathbf{m} = \mathbf{m}_0(1 + c) \approx \mathbf{m}_0$. Substituindo-se \mathbf{m} por \mathbf{m}_0 na equação II.15 e substituindo-se esta na equação II.14, tem-se:

$$d\Phi = \frac{1}{\mathbf{m}_0 I_r} c \vec{B}_e \cdot \vec{B}_r dV \quad \text{II.16}$$

sendo B_e o campo externo e B_r o campo recíproco à bobina de detecção.

Integrando-se a equação II.16 em todo o volume do material, a integral de fluxo total sobre um *loop* de uma bobina sensora fica sendo igual a (Bastuscheck *et al*, 1985):

$$\Phi = \frac{1}{\mathbf{m}_0} \int_{Vol} c \vec{B}_e(\vec{r}) \cdot \frac{\vec{B}_r(\vec{r})}{I_r} dr^3 \quad \text{II.17}$$

Na prática, principalmente em estudos biológicos, o volume de interesse contém diferentes substâncias distribuídas em diferentes regiões. Sendo assim, a integral de fluxo sobre o volume total pode ser considerada como sendo a soma da integral calculada independentemente para os diferentes subvolumes, ou seja:

$$\Phi = \frac{1}{\mathbf{m}_0} \sum_i \int_{Vol_i} c_i \vec{B}_e(\vec{r}) \cdot \frac{\vec{B}_r(\vec{r})}{I_r} dr^3 \quad \text{II.18}$$

II.6 – O Biossusceptômetro supercondutor

Desde a descoberta do SQUID, o susceptômetro supercondutor tem sido usado em grande escala para a análise da interação do campo magnético com a matéria, sendo de fundamental interesse para materiais fracamente magnetizáveis, como os diamagnéticos e paramagnéticos.

Um susceptômetro supercondutor consiste de um sistema de magnetização e de um sistema de detecção baseado em SQUID (Carneiro *et al*, 1999). Nos susceptômetros convencionais, o campo de magnetização é produzido por ímãs permanentes supercondutores (Paulson *et al*, 1990). Devido à presença desse campo e de ruídos magnéticos ambientais, o SQUID é mantido magneticamente blindado e a transferência do fluxo magnético de interesse é feita para ele através de uma bobina primária de detecção, ligada em série a uma outra bobina secundária, magneticamente acoplada ao magnetômetro. Esse conjunto de bobinas é denominado transformador de fluxo. A **figura II.6** mostra um esquema desse acoplamento. Quando um fluxo magnético atravessa a área da bobina de detecção, uma corrente proporcional ao valor instantâneo desse fluxo é induzida no transformador de fluxo que, por sua vez, gera um fluxo magnético através da bobina secundária, que atravessa a área do anel do magnetômetro.

O SQUID, juntamente com os acessórios supercondutores, fica resfriado em hélio líquido dentro de um recipiente adiabático superisolante (*dewar*). Os modernos susceptômetros mantêm os sistemas de bobinas de magnetização e detecção isolados do banho de hélio, mas termicamente conectados, para reduzir ruídos provocados pelo borbulhamento do líquido.

As bobinas de detecção são enroladas numa configuração gradiométrica para cancelar campos homogêneos, como o campo da terra e ruídos provenientes de fontes distantes. Isso é possível, com duas ou mais bobinas enroladas em oposição de fase e separadas por uma distância denominada linha de base (*lb*) (Bruno *et al*, 1986). Por exemplo, se a densidade de fluxo B_1 e B_2 , na **figura II.6**, forem iguais, a corrente induzida I_s será nula. A **figura II.7** mostra um perfil dos modelos de bobinas detetoras gradiométricas mais usadas em aplicações biomagnéticas. Essas configurações gradiométricas dotam o susceptômetro de sensibilidade e estabilidade suficientes para ser usado em ambientes não blindados magneticamente, onde o ruído ambiental é da ordem de 10^5 vezes maior do que o sinal a ser medido. A eficácia desse

tipo de sensor é sensivelmente melhorada se usado dentro de uma câmara magneticamente blindada. Uma blindagem altamente eficiente é feita com alumínio e mumetal. O primeiro tem a função de atenuar ruídos magnéticos de alta frequência e o segundo, de atenuar ruídos de baixas frequências ou campos estáticos constantes (Pasquarelli *et al*, 1998).

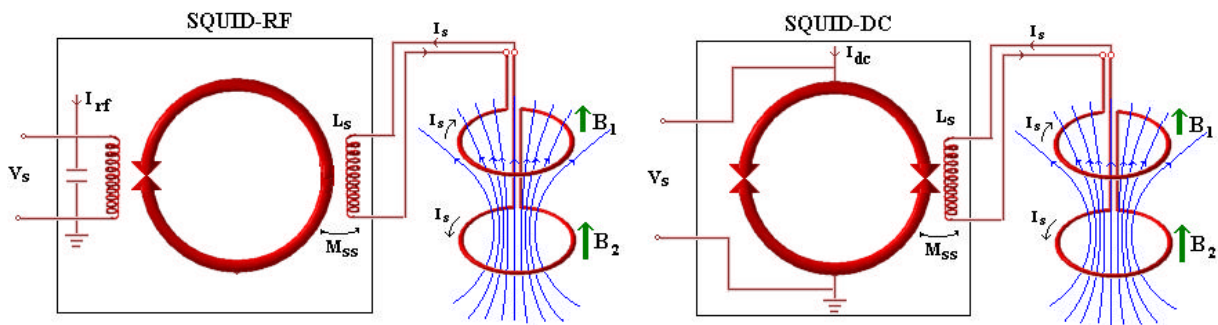


Figura II.6: Esquema do acoplamento do transformador de fluxo a um SQUID-RF e a um SQUID-DC. B é a densidade de fluxo magnético que atravessa a área da bobina sensora; I_s é a corrente induzida na bobina sensora; I_{dc} é a corrente dc de referência do SQUID-DC; I_{rf} é a corrente rf de referência do SQUID-rf; L_s é a indutância da bobina transformadora de fluxo e M_{ss} é a indutância mútua entre o anel do SQUID e a bobina de fluxo.

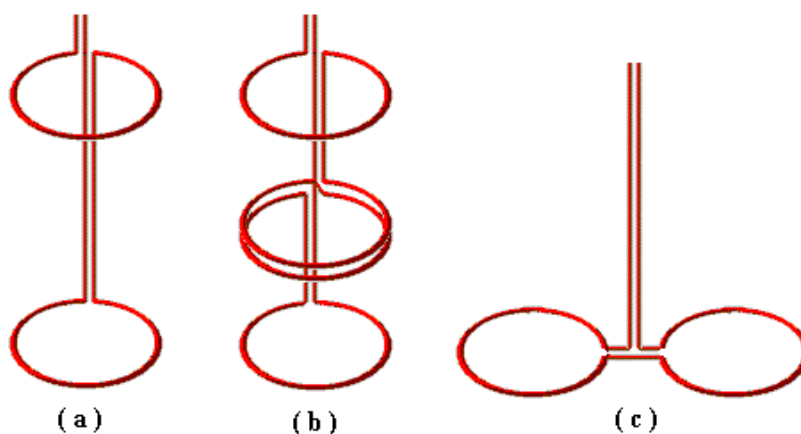


Figura II.7: Bobinas gradiométricas: a) axial de primeira ordem; b) axial de segunda ordem; c) planar de primeira ordem.

O posicionamento das bobinas detectoras dentro do campo magnetizante é feito de maneira que o fluxo total sobre as mesmas seja praticamente nulo, quando na ausência de amostra. Essa configuração necessária impõe limites no arranjo geométrico do sistema de magnetização. Dois tipos diferentes de campo têm sido usados para o estudo da suscetibilidade magnética do tecido hepático: 1- alternado e de baixa intensidade (Baastuscheck *et al*, 1985; Carneiro *et al*, 2000); 2- estático e de alta intensidade (Farrel *et al*, 1980; Hartman *et al*, 1992). O primeiro é gerado por um conjunto de grandes bobinas não supercondutoras (fios de cobre), arranjadas numa configuração que permite gerar um campo homogêneo na região das bobinas sensoras e fixadas desacopladas do sistema de detecção. O segundo é gerado por uma pequena bobina supercondutora, numa configuração geométrica equivalente a um gradiômetro de primeira ordem e simetricamente acoplada às bobinas detectoras. Essa configuração permite aplicar campos magnetizantes de até 50 mT na superfície da amostra, sem grandes comprometimentos na sensibilidade do sistema de detecção. Embora a magnetização alternada seja de baixa intensidade ($< 0,2$ mT), ela dota o susceptômetro de mesma sensibilidade que com a magnetização constante e de alta intensidade, porque permite a detecção síncrona com o uso da técnica lock-in (instrumento sensível a fase e amplitude).

II.7 – A Medida da suscetibilidade magnética no fígado

Além do tecido hepático, todos os outros, presentes em sua vizinhança, – pele, osso, gordura, ar, músculo, pulmão, etc – também serão magnetizados e contribuirão para a medida susceptométrica do fígado. Em uma pessoa com nível normal de ferro, por exemplo, a contribuição diamagnética devido à presença dos tecidos é muito mais intensa que a contribuição paramagnética devido à presença do ferro no tecido hepático e do ar nos pulmões. Conforme será mostrada no próximo capítulo, essa diferença é ainda mais crítica se a magnetização é gerada por pequenas bobinas, conforme ocorre com os susceptômetros dotados de sistema de magnetização supercondutor. Essa intensa contribuição diamagnética tem sido fortemente reduzida preenchendo-se com água o espaço entre o sensor e o torso, durante a medida, conforme se tem feito nos poucos susceptômetros existentes no mundo, para tal finalidade (Bastuscheck *et al*(1985), Farrel *et al*, (1980)).

Além da bolsa de água, os susceptômetros que fazem uso de um sistema de magnetização supercondutor, apresentados na literatura, usam um sistema de detecção

composto de duas ou mais bobinas gradiométricas concêntricas, com o intuito de minimizar ainda mais a contribuição diamagnética proveniente dos tecidos biológicos. Atualmente, a empresa americana *Tristan Technologies* já comercializa um susceptômetro dedicado para medidas susceptométricas do tecido hepático, com o sistema de magnetização supercondutor e um sistema de aquisição composto de três gradiômetros axiais de segunda ordem, acoplados a três magnetômetros SQUIDs. O custo desse equipamento é superior à U\$ 1.000.000,00, além de ser muito alto, o seu consumo de hélio líquido (~3 litros/dia).

As medidas susceptométricas são realizadas movendo-se o paciente durante a aquisição, estando ele inicialmente posicionado próximo ao sensor. À medida que o torso vai sendo distanciado, o fluxo magnético sobre as bobinas do sensor magnético vai sendo reduzido. As contribuições magnéticas provenientes das partes do torso que se encontram muito distantes do sensor podem ser desconsideradas. A **figura II.8** mostra um perfil da medida susceptométrica na região do fígado, usando-se um susceptômetro com sistema de magnetização supercondutor.

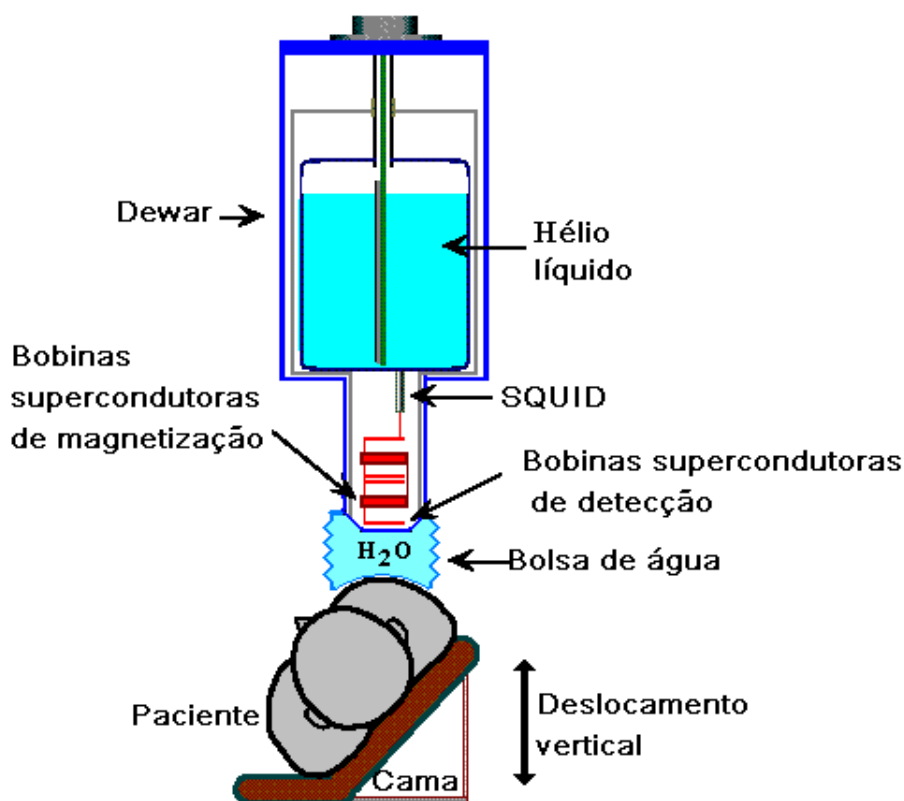


Figura II.8: Esquema da medida susceptométrica na região do fígado, usando-se um susceptômetro supercondutor baseado em SQUID.

II.7.1 – Quantificação do ferro no tecido hepático através da medida susceptométrica

Com o acoplamento de uma bolsa entre o torso e o sensor, a principal contribuição na medida será devido à presença do ferro no fígado. Embora o tecido pulmonar tenha uma suscetibilidade bem diferente da suscetibilidade da água, devido à grande quantidade de ar presente, ele fica distante do sensor e apresenta praticamente a mesma contribuição de fluxo magnético para um grupo de indivíduos do mesmo porte físico e isentos de sobrecarga de partículas magnéticas nos pulmões. Logo, sua contribuição, assim como a de todo o sistema, pode ser subtraída da medida final, seguindo-se determinados critérios.

A mudança do sinal de saída do susceptômetro (ΔV), devido à presença da amostra, é proporcional à variação do fluxo total ($\Delta\Phi$) sobre as bobinas detectoras, ou seja,

$$DV = C \Delta\Phi \quad \text{II.19}$$

sendo C o fator de calibração do susceptômetro. Esse fator pode ser determinado teoricamente, através dos parâmetros geométricos do transformador de fluxo e dos parâmetros do SQUID fornecidos pelo fabricante, ou fazendo-se medidas em amostras com suscetibilidade conhecida (Goldfarb *et al*, 1984; Fischer *et al*, 1989). É mais comum na literatura apresentar-se a resposta do susceptômetro em unidades de campo magnético, bastando para isso, substituir-se a equação II.19 na equação II.10, ou seja:

$$\Delta B = \frac{\Delta\Phi}{a} = \frac{\Delta V}{Ca} \quad \text{II.20}$$

De posse da relação II.19, a concentração de ferro no tecido hepático pode ser determinada ajustando-se os dados experimentais através da equação de fluxo (equação II.18), descrita para modelos geométricos definidos para o torso.

Bastuscheck *et al* (1985) apresentaram um modelo em que o volume de interesse do torso para a contribuição susceptométrica foi representado com geometria cilíndrica, compreendida com diferentes volumes regulares representando o tecido hepático, o tecido pulmonar e o tecido puramente diamagnético. A concentração de ferro era determinada ajustando-se os dados experimentais com a curva teórica de fluxo (do tipo apresentado pela equação II.18), calculada para tal modelo. Fischer e colaboradores têm usado um modelo em que o torso é representado por uma semi-esfera e o fígado, por uma elipsóide, e todas as outras

contribuições devido à presença dos outros tecidos biológicos vizinhos ao fígado, cuja suscetibilidade magnética difere do da água, são representadas por um fator linear que depende de alguns parâmetros, como a geometria do torso e a densidade de gordura, dentre outros. A concentração de ferro também é determinada com o ajuste dessa curva.

Um outro método usado por Brittenham *et al* (1983) para determinar a concentração de ferro no tecido hepático, através de medidas susceptométricas, usando-se um susceptômetro similar ao usado por Farrel *et al* e Fischer *et al*, consistiu no uso da seguinte expressão:

$$c_{fe} = a \exp[bd(\Delta V - \Delta \bar{V})] \quad \text{II.21}$$

sendo a e b parâmetros fixados pelas geometrias do instrumento e determinados por calibração, com o uso de amostras de referências. A constante $\Delta \bar{V}$ representa a média da resposta do susceptômetro para medidas feitas num grupo de pessoas com deficiência de ferro no organismo (anemia ferropriva). Esse método não leva em consideração as variações nas dimensões dos órgãos, podendo, no entanto, gerar erros consideráveis na avaliação da concentração do ferro hepático.