

Determinação da protoporfirina-zinco por hematofluorímetro portátil: investigação sobre validade dos dados

JOÃO PRISTA
RUI PINTO
PEDRO AGUIAR

A determinação da protoporfirina-zinco (PPZ) por meio de um hematofluorímetro portátil vem sendo descrita como apreciável contributo no contexto da vigilância de saúde de trabalhadores expostos a chumbo.

Num estudo abrangendo 178 indivíduos (cerca de 60% dos quais referenciados como profissionalmente expostos àquele metal) foi testado o método e a técnica propostos e estudada a validade dos resultados assim obtidos.

Concluiu-se que a determinação da PPZ em sangue colhido por punção capilar, por meio de hematofluorímetro portátil, oferece resultados fiáveis, permitindo, deste modo, o recurso a esta técnica de fácil execução e baixo custo.

Introdução

Um importante instrumento na vigilância da saúde de trabalhadores expostos a substâncias químicas (tóxicos) reside na possibilidade de quantificação, nos meios orgânicos, dos designados *indicadores biológicos*

□

João Prista é médico do trabalho e assistente da ENSP/UNL (grupo de disciplinas de Saúde Ocupacional).

Rui Pinto é licenciado em Farmácia, Clínica Médica e Diagnóstico Dr. Joaquim Chaves, Unidade de Farmacologia e Farmacotoxicologia da UL.

Pedro Aguiar é mestre em Probabilidades e Estatística, ENSP/UNL (grupo de disciplinas de Epidemiologia e Biostatística).

cos de exposição (BEI), *quer de dose* (quando se trata da própria substância ou de um seu metabolito), *quer de efeito* (quando se referem a produtos gerados em alterações metabólicas — geralmente reversíveis — derivadas da acção do tóxico). Na avaliação da exposição a tóxicos, estes indicadores constituem elementos do maior rigor e utilidade, já que são influenciados pelas características biológicas individuais de cada trabalhador e têm em conta as diversas vias de exposição (eventualmente extraprofissionais) e de absorção (Prista e Uva, 2002).

A selecção de indicadores biológicos de exposição exige não só que sejam adequados, fundamentalmente específicos e sensíveis, mas ainda que se tenham em conta aspectos relacionados com a respectiva «aplicabilidade», como são os casos da simplicidade ou complexidade das técnicas e dos equipamentos de medição ou do custo de tais avaliações (WHO, 1996).

Na exposição a chumbo (designadamente de natureza profissional), o efeito crítico da acção deste metal situa-se ao nível da cadeia de síntese da hemoglobina.

Tal efeito (melhor dito, conjunto de efeitos) consiste na inibição de diversas enzimas, sendo mais notório e precoce em relação à desidratase do ácido delta-aminolevulínico (ALA-D), responsável pela transformação do ácido delta-aminolevulínico (ALA) em porfobilinogénio (PBG), e da ferroquelatase que catalisa a incorporação do ferro na molécula de protoporfirina IX (PPE). Destas inibições enzimáticas

resulta a acumulação dos respectivos substratos, no caso, o ALA e a PPE, respectivamente (*Figura A*). É deste conhecimento que deriva o facto de a investigação científica sempre ter mostrado um particular interesse no comportamento destas enzimas e dos respectivos substratos a fim de estabelecer um quadro de compreensão dos reflexos da exposição a chumbo sobre a saúde dos indivíduos expostos e proporcionar métodos de adequada vigilância dos efeitos dessa exposição.

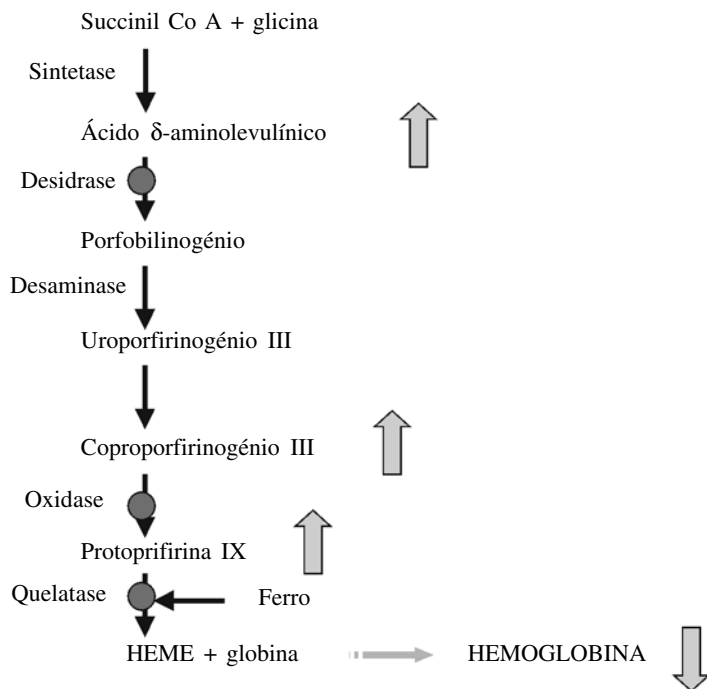
Nestas circunstâncias, a acumulação da protoporfirina nos eritrócitos indicia a intensidade de acção de uma dada quantidade de chumbo absorvido e, portanto, o seu doseamento constitui-se como um indicador biológico da exposição ao chumbo (Harada e Miura, 1984). Os iniciais métodos laboratoriais de doseamento desta substância, contudo, tornavam pouco prática a sua utilização, em virtude dos custos e tempo inerentes às técnicas então exigidas (Fischbein *et al.*, 1981).

Desde os trabalhos de Lamola e Yamane (1974) que se conhece que, em certas condições (absorção de chumbo, deficiência de ferro, porfiria eritropoiética), a falta de união do ferro à protoporfirina determina que este não seja nela substituído pelo zinco, originando-se

a formação da designada protoporfirina-zinco (PPZ). Ou seja, na intoxicação crónica pelo chumbo, caso que nos interessa aqui em particular, a protoporfirina acumulada por via da inibição da ferroquelatase não está, na sua maior parte, na forma livre, mas sim ligada ao zinco existente no organismo. De facto, a PPZ representará, nestas casos, até cerca de 90% da PPE total (Espana, 1986). Esta PPZ reflecte, assim, a acção do chumbo sobre o sistema hematopoiético, resultando principalmente dos depósitos de chumbo na medula óssea (Zwennis, Franssen e Wijns, 1990).

Tal facto permitiu «simplificar» os processos tecnológicos para o seu doseamento basicamente pela possibilidade de recurso a técnicas de fluorescência. Em particular, um equipamento portátil designado por hematofluorímetro, especificamente destinado à determinação da PPZ, passou a disponibilizar um método de fácil execução e baixo custo, proporcionando elevadas comodidade e possibilidades às exigências da vigilância biológica na exposição profissional a chumbo. A técnica requerida exige tão-só a recolha de algumas gotas de sangue capilar (extremidade do dedo, lóbulo da orelha, ...) e o resultado é apresentado em cerca de dois segundos. A tecnologia

Figura A
Cadeia de síntese do heme



requerida e a simplicidade técnica, por seu lado, permitem custos diminuídos, estimando-se, por exemplo, que cada determinação da PPZ (por este método) se situe em níveis de cerca de 30% a 40% do preço de uma plumbemia a valores da tabela praticada pelo Serviço Nacional de Saúde.

Porque a vigilância de saúde na exposição profissional a tóxicos se faz face a grupos populacionais frequentemente com considerável dimensão e é, por definição, regular e sistemática, questões como a simplicidade das técnicas e a diminuição dos custos requerem pertinente atenção.

Se a PPZ não é apenas influenciada pela quantidade de chumbo presente no organismo, e dado que ela não tem constituído entre nós um parâmetro utilizado, importará esclarecer se o seu quadro de variação regista os mesmos padrões que a investigação tem produzido noutras regiões geográficas.

Não deverá haver interferências por motivos da porfíria eritrocitária. Além de ser uma patologia rara, a maioria dos estudos indica que a detecção da PPZ por fluorimetria, nestes casos, se faz em espectros de fluorescência um pouco diferentes dos registados para os casos em que tem origem na influência do chumbo ou no défice de ferro. Confundimentos possíveis para estes dois casos, entretanto, tornam pertinente o estudo desta matéria. Ou seja, importará estudar como se evidenciam a sensibilidade e a especificidade da PPZ e as suas relações, designadamente com a plumbemia, em trabalhadores portugueses com exposição profissional a chumbo.

Algumas questões directamente relacionadas com a metodologia e técnica propostas requerem, contudo, prévio esclarecimento.

O estudo visou pesquisar, relativamente aos valores de PPZ determinados em sangue colhido por punção capilar:

- Se são equivalentes aos registados em sangue de colheita venosa (técnica mais invasiva e dispendiosa);
- Se haverá interferências derivadas do *status* hemoglobínico de cada indivíduo analisado (o que implicaria o acréscimo de análises, designadamente o hematócrito);
- Se são compatíveis com o doseamento da PPZ em laboratório (técnica menos prática e mais dispendiosa) sem margem de erro que coloque em causa a sua validade.

Material e métodos

O estudo abrangeu 178 indivíduos do sexo masculino com idades compreendidas entre os 21 e os 64 anos

e seleccionados em dois subgrupos: com e sem exposição profissional a chumbo inorgânico. Do total, 70 (39,3%) revelaram plumbemias inferiores a 40 µg/dL (média de 24,71 µg/dL) e os restantes 108 plumbemias iguais ou superiores àquele valor (média de 60,44 µg/dL).

A cada indivíduo foram efectuadas duas colheitas de sangue: uma de sangue capilar por punção da extremidade do 4.º dedo da mão direita; outra de sangue venoso por punção do sangradouro do membro superior esquerdo.

A determinação directa da PPZ (em cada amostra de sangue colhido) foi efectuada por meio de um hematofluorímetro (ProtoFluor-Z® da marca Helena Laboratories). A unidade funcional deste equipamento contém uma lâmpada de halogéneo cuja luz é colectada e filtrada para produzir um feixe com comprimento de onda de 415 nm. A excitação da PPZ por este feixe origina uma onda com um comprimento de onda de 595 nm que, colectado num tubo fotomultiplicador, produz uma corrente de intensidade proporcional à relação PPZ/heme. O equipamento apresenta os resultados em µmol PPZ/mol de heme, mas permite seleccionar a sua apresentação em unidades de µg PPZ/dL de sangue, conversão que faz automaticamente.

Cada colheita (cerca de 75 µL) foi efectuada em tubo de hematócrito heparinizado e vertida para tubo de ensaio, onde foram adicionadas duas gotas de reagente próprio fornecido pelo fabricante. Após ligeira agitação do tubo (para homogeneização da mistura), o sangue foi colocado em lamela de vidro e esta introduzida no aparelho (através do porta-lâminas), procedendo-se à leitura que aparece num *écran* de visualização em cerca de dois segundos.

Antes de cada leitura sobre a amostra, cada lamela foi sujeita a leitura sem gota de sangue, sendo rejeitadas aquelas que revelaram leituras superiores a 3 (referência que foi adoptada em virtude de, para calibração, ser esse o limite de variação aceite pelas instruções do fabricante). O valor de PPZ assumido no final de cada leitura foi o da leitura registada subtraída do valor de leitura da respectiva lamela. Dado que o equipamento permite a escolha de calibração para um de dois valores fixos de hematócrito (35% e 42%), escolheu-se este último por se constatar (por leitura aleatória de resultados analíticos) ser mais aproximado dos valores habituais em grupos de trabalhadores considerados saudáveis. Os valores de PPZ dados pelo hematofluorímetro foram, posteriormente, corrigidos em função do hematócrito real, segundo a fórmula «valor da leitura × (hematócrito real/42)».

Em cada sessão de colheitas (15 a 20 indivíduos) efectuou-se prévia aferição do hematofluorímetro,

consoante as instruções do fabricante e com dois padrões (alto e baixo) por este fornecidos. O mesmo procedimento foi repetido a meio e no final de cada sessão.

As amostras de sangue venoso colhidas foram enviadas a laboratório de patologia clínica para determinação laboratorial dos seguintes parâmetros: hematócrito, plumbemia (PbS), protoporfirina eritrocitária (PPE) e protoporfirina-zinco (PPZ).

As determinações laboratoriais da protoporfirina-zinco (PPZ) foram feitas de acordo com o método descrito por Lamola e col. (1975). Trata-se de um método fluorimétrico que usa sangue total como matriz de análise. A técnica é realizada após hemólise da amostra com um detergente não iónico (óxido de dimetildodecilamina) dissolvido em tampão fosfato e utiliza como comprimento de onda (λ) de excitação os 424 nm e como λ de emissão os 594 nm. Os resultados obtidos são expressos em $\mu\text{g PPZ/dL}$ e foram calculados a partir da razão entre a intensidade de emissão da amostra em análise e a intensidade de emissão de uma solução-padrão de PPZ (0,05 $\mu\text{g/ml}$). Para tratamento estatístico dos dados foi utilizado o programa SPSS (versão 10). Após análise descritiva dos dados foram investigadas as hipóteses pelo método de correlação de Spearman em virtude de se ter constatado uma distribuição de variáveis não gaussianas. Consideraram-se como estatisticamente significativos os resultados inferenciais representados por $p < 0,05$ (nível de significância de 5%).

Resultados

Os resultados obtidos nas determinações efectuadas apresentam-se na *Tabela 1*.

As determinações de PPZ em laboratório situam-se numa escala quantificável a partir de 5 $\mu\text{g/dL}$ (o

método utilizado não permite discriminações abaixo deste valor), sendo os resultados inferiores a este limite indicados como «< 5». Verificaram-se 34 resultados nestas circunstâncias (19,1%), tendo sido arbitrariamente atribuído a estes casos o valor 4 para efeitos de cálculo estatístico.

Discussão

Uma primeira constatação situa-se ao nível da estabilidade do equipamento. Em cada sessão, e após a inicial calibração, as aferições efectuadas com os padrões do fabricante a meio e no final de cada sessão revelaram sempre a não necessidade de rectificações por coincidência das leituras.

Refira-se ainda que em fase de pré-testes e de modo aleatório foram efectuadas algumas determinações repetidas em sangue do mesmo indivíduo (os casos foram propositadamente escassos por razões que se prendem com a incomodidade para o indivíduo analisado). Em todos os casos se verificou que os resultados se situavam em padrões de aceitabilidade (diferenças de ± 3 entre as sucessivas leituras), pelo que se admitiu como aceitável a reprodutibilidade da técnica. A observação da distribuição dos valores de leitura directa no hematofluorímetro para os sangues capilar e venoso (*Figura B*) denota um mesmo padrão, com um valor sistematicamente mais elevado para os resultados relativos ao sangue capilar. São valores fortemente correlacionados ($r = 0,974$ para $p < 0,01$), pelo que pode concluir-se que uma ou outra determinação são equivalentes entre si.

A comparação entre os valores de leitura directa do hematofluorímetro e os correspondentes valores corrigidos pelo hematócrito real (*Figura C*) permite identificar uma diferença pouco relevante (média de 2,71 $\mu\text{g/dL}$) e a existência de uma forte correlação

Tabela 1
Resultados das várias determinações de protoporfirina-zinco ($\mu\text{g/dL}$)

	Leitura directa em hematofluorímetro		Valores calculados após correcção pelo hematócrito		Doseamento em laboratório (PPZ)
	Sangue capilar	Sangue venoso	Capilar (corrigido)	Venoso (corrigido)	
Mínimo	19	13	18,5	13,3	< 5
Máximo	347	346	431,7	328,7	211
Mediana	40	29	42,36	31,04	13,5
Média	75,01	58,71	77,72	60,7	32,88
Desvio-padrão	73,55	60,69	76,08	61,86	42,16

($r = 0,989$ para $p < 0,01$). Assim, podem assumir-se como pertinentes os valores obtidos por leitura sem correcção, ou seja, que se dispensa para efeitos de rotina a necessidade de determinação do hematócrito para posterior correcção dos valores da PPZ.

Aceite que os valores de PPZ por leitura directa no sangue capilar e sem correcção pelo hematócrito

são de adequada utilização, e comparando-os com as correspondentes determinações de PPZ em laboratório, segundo os métodos descritos, conclui-se que os mesmos são fortemente correlacionados ($r = 0,893$ para $p < 0,01$). Assim, pode considerar-se que o método de leitura directa é em absoluto fidedigno.

Figura B
Distribuição dos resultados de determinação da PPZ em sangue capilar e sangue venoso ($\mu\text{g/dL}$)

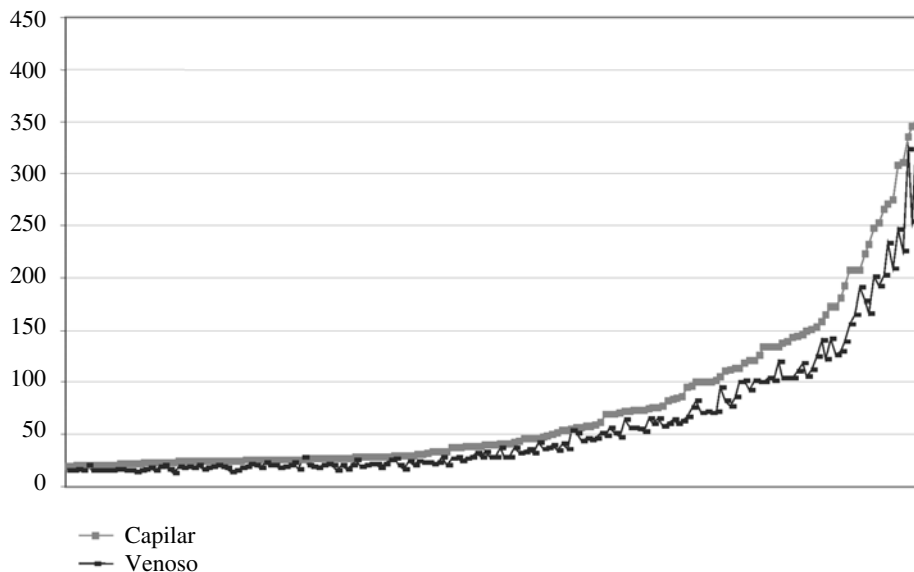
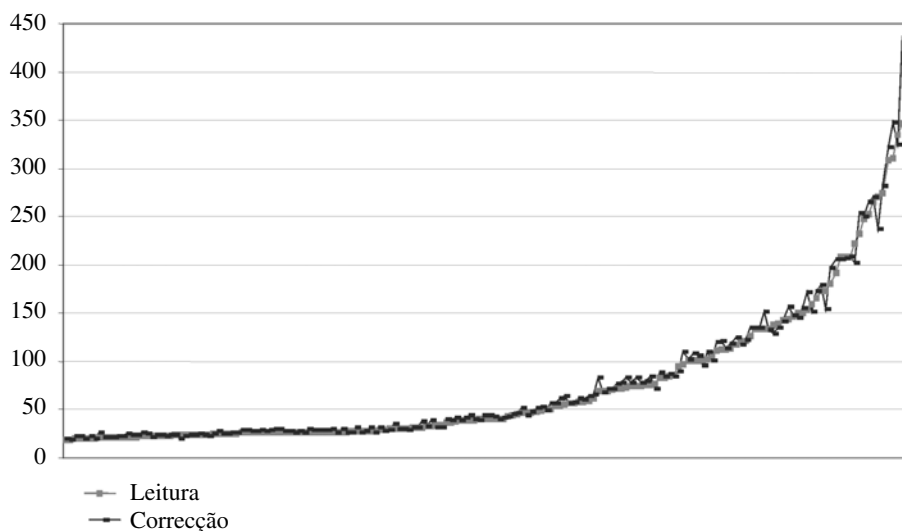


Figura C
Distribuição de resultados de determinação da PPZ em sangue capilar: leitura directa e correcção pelo hematócrito real ($\mu\text{g/dL}$)



Conclusões

Da análise dos dados obtidos e discutidos pode concluir-se que:

- O método de determinação da PPZ por leitura directa em hematofluorímetro portátil oferece resultados fiáveis;
- Para recurso a este método, a colheita de sangue por punção capilar e a utilização da leitura sem necessidade de correcção (técnica mais simples) são totalmente válidas.

Deste modo, comprova-se que a metodologia e a técnica por colheita capilar para determinação da protoporfirina-zinco (PPZ) são válidas e fiáveis, permitindo a sua utilização, designadamente no âmbito de programas de vigilância de saúde na exposição profissional a chumbo.

A simplicidade da técnica e o seu baixo custo, entretanto, constituem vantagens adicionais.

□ Bibliografia

CHISOLM, J. J., *et al.* — A simple protoporphyrin assay-microhematocrit procedure as a screening technique for increased lead absorption in young children. *The Journal of Pediatrics*. 84 : 4 (1974) 490-496.

EISINGER, J., *et al.* — Zinc protoporphyrin in blood as a biological indicator of chronic lead intoxication. *Journal of Environmental Pathology and Toxicology*. 1 (1978) 897-910.

ESPAÑA. Ministerio del Trabajo y Assuntos Sociales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene — NTP 160 : la ZPP como marcador biológico en la detección precoz del saturnismo. Barcelona : INSHT, 1987 («Notas Técnicas de Prevencion», 160).

FISCHBEIN, A., *et al.* — Fluorometric zinc protoporphyrin determination in blood : a practical method for the detection of chronic lead poisoning. New Jersey : City University of New York. Mount Sinai School of Medicine. Environmental Sciences Laboratories. Department of Community Medicine, 1981.

FROOM, P., *et al.* — Predictive value of determinations of zinc protoporphyrin for increased blood lead concentrations. *Clinical Chemistry*. 44 : 6 (1998) 1283-1288.

GRANJEAN, P.; LINTRUP, J. — Erythrocyte-zn-protoporphyrin as an indicator of lead exposure. *Scandinavian Journal of Clinical Laboratorial Investigation*. 38 (1978) 669-675.

HARADA, K.; MIURA, H. — Free erythrocyte protoporphyrin (FEP) and zinc protoporphyrin (ZnP) as biological parameters for lead poisoning. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 53 (1984) 365-377.

LAMOLA, A. A.; JOSELOW, M.; YAMANE, T. — Zinc protoporphyrin (PPZ) : a simple, sensitive, fluorometric screening test for lead poisoning. *Clinical Chemistry*. 21 : 1 (1975) 93-97.

LAMOLA, A. A.; YAMANE, T. — Zinc protoporphyrin in the erythrocytes of patients with lead intoxication and iron deficiency anemia. *Science*. 186 (1974) 936-938.

McELVAINE, M. D., *et al.* — Evaluation of the erythrocyte protoporphyrin test as a screen for elevated blood lead levels. *The Journal of Pediatrics*. 119 : 4 (1991) 548-550.

NICOLL, C. D.; PIGNONE, M.; DETMER, W. M. — Diagnostic testing & medical decision making. In TIERNEY, L. M.; McPHEE, S. J.; PAPADAKIS, M. A. — Current Medical Diagnosis & Treatment. 40th edition. New York : Lange/McGraw-Hill, 2000, 1617-1627.

PRISTA, J.; UVA, A. S. — Aspectos gerais de toxicologia para médicos do trabalho. Lisboa : ENSP.ÚNL, 2002 («Obras Avulsas», 6).

QAZI, Q. H.; MADAHAR, D. P. — A simple rapid test for lead poisoning. *The Journal of Pediatrics*. 79 : 5 (1971) 805-808.

STANTON, N. V., *et al.* — Empirically determined lead-poisoning screening cutoff for the protofluor-z hemato-fluorometer. *Clinical Chemistry*. 35 : 10 (1989) 2104-2107.

TURCK, D. S., *et al.* — Sensivity of erythrocyte protoporphyrin as a screening test for lead poisoning. *The New England Journal of Medicine*. 326 : 2 (1992) 137-138.

WHO — Biological monitoring of chemical exposure in the workplace: guidelines : contribution to the International Programme on Chemical Safety (IPCS). Geneva : WHO, 1996 (WHO/HPR/OCH 99.1).

WILDT, K.; BERLIN, M.; ISBERG, P. E. — Monitoring of zinc protoporphyrin levels in blood following occupational lead exposure. *American Journal of Industrial Medicine*. 12 : 4 (1987) 385-398.

ZWENNIS, W. C.; FRANSSSEN, A. C.; WIJNANS, M. J. — Use of zinc protoporphyrin in screening individuals for exposure to lead. *Clinical Chemistry*. 36 : 8 (1990) 1456-1459.

□ Summary

DETERMINATION OF ZINC-PROTOPORPHYRIN USING A PORTABLE HEMATOFLUOROMETER: DATA VALIDATION STUDY

The determination of zinc-protoporphyrin (ZPP) using a portable hematofluorometer, has been described as an outstanding contribution for health surveillance of workers exposed to lead.

In a study of 178 individuals (about 60% of them referenced as occupationally exposed to that metal) the proposed method and techniques were tested and the validity of the obtained results was studied.

It was concluded that the determination of ZPP using a portable hematofluorometer, in blood collected by a fingerstick, gives warrantable results enabling, therefore, the use of this technique which is of easy accomplishment and low cost.