

MÉTODOS DE ESPECTROMETRIA DE MASSA EM NUTRIÇÃO HUMANA

SPECTROMETRIC METHODS IN HUMAN BODY MASS

MÁRCIA VARELLA MORANDI JUNQUEIRA FRANCO*, ANDREA FERREIRA SCHWARTZ TANNUS**,
VIVIAN MARQUES MIGUEL SUEN***, JÚLIO SÉRGIO MARCHINI****.

RESUMO

A espectrometria de massa está sendo utilizada cada vez mais freqüentemente na Medicina clínica, principalmente quando o homem é o objeto do experimento e, assim, diferentes aspectos do metabolismo intermediário são passíveis de estudo. Os isótopos estáveis são inócuos ao ser humano, portanto é possível utilizá-los em mulheres grávidas e crianças. Com o aumento da disponibilidade dos isótopos estáveis e laboratórios que trabalham com esta técnica, seu uso está se tornando cada vez mais difundido em nosso meio. A espectrometria de massa permite estudar, por exemplo, os processos envolvendo síntese e degradação protéica, o estudo do metabolismo intermediário e as relações intrínsecas entre lipídios, aminoácidos e hidratos de carbono. Permite diagnosticar defeitos de absorção de gordura, estudar a cinética de vitaminas e a absorção de minerais.

Palavras-chave: Marcação por isótopo; Diagnóstico clínico; Nutrição

INTRODUÇÃO

A aplicação da espectrometria de massa e o uso de isótopos estáveis na Medicina clínica constituem eventos cada vez mais freqüentes e atuais, principalmente quando o homem é o objeto do experimento. Os isótopos estáveis de carbono, nitrogênio, oxigênio, hidrogênio e de vários minerais têm sido utilizados como marcadores inócuos ao homem, podendo ser utilizados em mulheres grávidas e crianças. Dessa maneira, os diferentes aspectos do metabolismo intermediário são possíveis de serem estudados. Há um aumento em nosso meio da disponibilidade dos isótopos estáveis e laboratórios que trabalham com a técnica de espectrometria de massa. No Brasil, estes estudos estão sendo feitos no Laboratório de Espectrometria de Massa do Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrição da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP. São estudos em reciclagem protéica, gasto energético, composição corporal, entre outros.

Anteriormente, o uso de isótopos estáveis era restrito, por duas razões: 1) são elementos relativamente caros em comparação ao similar radioativo; 2) os instrumentos para detecção e medida dos isótopos não eram disponíveis, além de terem difícil manutenção. Hoje, com o aperfeiçoamento de técnicas, aparelhos sensíveis e uma vasta quantidade de isótopos disponíveis, seu uso foi ampliado e o custo diminuiu. Quantidades pequenas de amostras são suficientes para análise com técnicas analíticas moder-

nas, por isso o uso desses isótopos é interessante para pesquisa e diagnósticos pediátricos.

O termo isótopo estável é comumente utilizado para designar formas poucos abundantes de isótopos pesados, não-radioativos e, portanto, inócuos aos seres humanos. Estes isótopos estão amplamente distribuídos no meio ambiente, fazendo parte da composição tanto de seres vivos animados como na de inanimados. Todos os átomos de um elemento têm por definição o mesmo número de prótons em seu núcleo. Já a massa atômica depende do número de prótons e nêutrons, podendo possuir diferentes números de nêutrons. Devido ao idêntico número de prótons, eles ocupam a mesma (*iso*) posição (*topos*) na tabela periódica. Certos isótopos, como o ^{14}C , são radioativos e se desintegram, emitindo partículas lesivas aos seres biológicos. No entanto, os isótopos estáveis, como o ^{13}C , não se desintegram nem emitem qualquer radiação ionizante. Devido à diferença de massa, os isótopos estáveis de um mesmo elemento diferem em seu procedimento físico, químico e bioquímico, resultando em efeitos isotópicos cinéticos e termodinâmicos. A maioria dos elementos químicos consiste de uma mistura de isótopos estáveis, que não são sujeitos a nenhuma desintegração radioativa^{1,2,3}. Dessa forma, a incorporação desses isótopos estáveis em moléculas de interesse biológico permite sua utilização em experimentos, tendo como objeto o homem, de qualquer idade, sem submetê-lo a nenhuma exposição radioativa. Sua utilização, porém, depende da sua proporção na natureza, sendo úteis para estudos metabólicos aqueles isótopos que aparecem em menor proporção (menos que 10%) em relação ao isótopo mais

* Farmacêutica-bioquímica; doutora

**Nutricionista; doutora

***Médica; doutora

****Médico; doutor

Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrição Clínica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

Trabalho realizado no Serviço de Oftalmologia – Departamento de Cirurgia – Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Uberlândia.

Endereço para correspondência:

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP
Departamento de Clínica Médica, Divisão de Nutrição Clínica
Av. Bandeirantes, 3900,
CEP: 14049-900 –
Ribeirão Preto – SP
e-mail:jsmarchi@fmrp.usp.br

Data de Submissão:

01/07/2003

Data de Aprovação:

05/01/2004

abundante, permitindo, assim, que sejam enriquecidos e reconhecidos. Um outro fator, não menos importante e aparentemente óbvio, é que o elemento isotópico em questão esteja presente no organismo humano em quantidades mensuráveis. O ^{12}C apresenta-se na proporção de 98,9%, o ^{13}C na proporção de 1,1%. O organismo humano tem 18% de carbono. O enriquecimento do ^{13}C superior a 1,1% torna a separação possível de ser realizada e distinguível das substâncias que contenham a proporção natural de ^{12}C (98,9%)¹.

As vantagens dos isótopos estáveis, quando comparadas aos radioativos, são várias: 1) não expõem o paciente à radiação; 2) podem ser aplicados a pessoas saudáveis ou não e de várias idades, desde recém-nascidos até idosos e gestantes, mesmo quando utilizados em maiores quantidades com o objetivo de aumentar a especificidade e sensibilidade do método empregado na sua determinação. Outra vantagem é que o metabolismo de compostos com nitrogênio e oxigênio podem ser estudados, pois os mesmos não possuem equivalentes radioativos (de meia vida longa) para serem usados. O uso de isótopos estáveis permite a administração simultânea de diferentes isótopos, como ^{13}C e ^{15}N , ligados a aminoácidos em dosagens repetidas⁴.

O organismo humano não somente absorve diferentes isótopos dos elementos, após administração de traços no contexto de pesquisa e diagnósticos clínicos, como também é constantemente exposto a estes isótopos estáveis devido a sua ocorrência natural em alimentos, água e ar¹.

A espectrometria de massa tem sido o método analítico mais aplicado à quantificação de enriquecimento isotópico em amostras biológicas obtidas durante os estudos com isótopos estáveis. As razões pelas quais isso acontece são aparentes. A espectrometria de massa é o mais rápido, mais sensível, mais específico e mais preciso método analítico praticável pela comunidade biomédica. Teoricamente, desde que a espectrometria de massa tem a função de determinar a massa e, como todos os substratos bioquímicos têm massa, este método é potencialmente útil a todos pesquisadores que estudam o metabolismo e suas desordens. O método é, geralmente, combinado com outras técnicas, tais como cromatografia gasosa, ionização térmica, bombardeamento de átomos e a técnica de plasma indutivo, acoplada à espectrometria de massa⁵.

APLICAÇÕES CLÍNICAS DO ISÓTOPO ESTÁVEL NA NUTRIÇÃO HUMANA

Esta técnica tem sido aplicada em estudos metabólicos no homem, assim como sua utilização em estudos de biodisponibilidade de nutrientes, entre outras aplicações clínicas relevantes^{6,7,8,9}. Isso se deve à especificidade da técnica de espectrometria de massa e à segurança da utilização

do isótopo estável no homem. As aplicações clínicas incluem o diagnóstico de doenças que alteram o metabolismo de ácidos orgânicos, como os aminoácidos e, simultaneamente, análises multicomportamentais (nos diferentes compartimentos do organismo) se mostram úteis na identificação de vias metabólicas anormais (estudo do metabolismo protéico, de hidratos de carbonos e lipídeos). Assim, são passíveis de serem estudados os ácidos orgânicos, como os ácidos metilmalônico (acidúria metilmalônica) e fenilcetonúria; ácidos graxos de cadeia curta; compostos orgânicos voláteis, como as cetonas e aldeídos, polióis, aminas, prostaglandinas, esteróides, ácidos biliares, constituintes dos ácidos nucléicos e aminoácidos^{2,8,10,11}.

ESTUDO DO METABOLISMO PROTÉICO E AMINOACÍDICO

A utilização da L- ^{13}C -leucina para avaliação da cinética protéica corporal teve um grande impulso com o surgimento de técnicas em cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Mais precisas, estas técnicas permitiram determinar o enriquecimento de produtos intermediários do metabolismo, em concentração de nanomols. Como a leucina é um aminoácido essencial, ela somente pode ser encontrada quando proveniente da dieta ou liberada a partir da degradação protéica. A leucina tanto pode ser oxidada de maneira irreversível a CO_2 , como também pode ser incorporada em proteína, síntese protéica. No estado de equilíbrio metabólico, a quantidade total de leucina ("pool" metabólico), também está em equilíbrio, ou seja, a quantidade de leucina que entra no plasma (taxa de aparecimento) é igual à que sai (taxa de desaparecimento). Quando se faz a infusão constante de ^{13}C -leucina, o ponto de equilíbrio, no plasma, é atingido em 2 a 3 horas. Este fato significa que cada molécula de leucina marcada é diluída por uma quantidade constante de leucina natural e que passa a fazer parte do "pool" orgânico de leucina, conjuntamente. Nesse momento, a razão entre a leucina marcada e a não-marcada é igual à razão do débito de perfusão do ^{13}C -leucina e à taxa de aparecimento endógeno da leucina².

Volpi et al. (1998) determinaram, em indivíduos idosos saudáveis, que o aumento da disponibilidade de aminoácidos levou ao aumento do transporte de aminoácidos e estimulou a incorporação de aminoácidos pelo músculo, promovendo a síntese protéica. A síntese e a quebra de proteína no músculo e o transporte de aminoácidos foram medidos no estado basal e durante a infusão intravenosa de uma mistura de aminoácidos marcados isotopicamente. O material utilizado para análise da cinética de aminoácidos marcados no músculo foi o sangue da artéria femoral e a biópsia de músculo lateral da perna, acima do

joelho. Os resultados obtidos mostraram que, com a infusão dos aminoácidos marcados, houve um aumento significativo na liberação de aminoácidos para as pernas, assim como a síntese de proteínas. A degradação de proteínas não foi modificada durante a infusão, o que levou a um balanço positivo de aminoácidos que atravessaram o músculo. Esses resultados levaram à conclusão de que, embora ocorra perda de massa muscular com o avanço da idade, esta pode ser mais bem mantida, se for aumentada a ingestão de proteínas ou aminoácidos¹².

O estudo realizado por Borel et al. (1998) teve como objetivo identificar as conseqüências metabólicas da anemia falciforme na homeostase de proteínas, carboidratos e lipídeos e também determinar como estas alterações afetam o gasto energético. Em pacientes com anemia falciforme tem sido observado que o gasto de energia é elevado, mas não é completamente compreendido como ocorrem as alterações no metabolismo das proteínas, carboidratos e lipídios. Neste estudo, foram avaliados os indivíduos de um grupo de africanos portadores de anemia falciforme, e um outro grupo controle, também de indivíduos africanos, que não eram portadores da doença. Todos os indivíduos receberam, por meio de um catéter, uma infusão de leucina marcada com ¹³C, glicose marcada com ²H₂ e glicerol marcado com ²H₅. Os autores puderam concluir que a quebra e a síntese de proteínas realmente são maiores nos indivíduos portadores de anemia falciforme, o que contribui com o aumento do gasto energético. Já a alteração do metabolismo basal da glicose nesses indivíduos foi similar à do grupo controle, não havendo aumento do gasto energético. Quanto à lipólise corporal, esta foi efetivamente maior para os indivíduos com anemia falciforme do que para o grupo controle, o que pôde contribuir para o aumento do gasto energético nos indivíduos em estudo¹³.

Vários outros estudos têm utilizado a metodologia dos isótopos estáveis para determinar a razão de sínteses fracionadas de proteína, no *pool* muscular humano. No estudo realizado por Hasten et al. (1998)¹⁴, foi proposto o método para isolar a miosina e a actina de músculo humano, para quantificação de leucina marcada com ¹³C. A razão de síntese fracionada de miosina e actina foi comparada com a do *pool* muscular dos mesmos indivíduos estudados. Em indivíduos infectados com o vírus HIV, a perda de peso é caracterizada pela redução da massa magra. A patogênese desse fato, em particular da perda de proteína muscular, é ainda desconhecida. Yarasheski et al. (1998) avaliaram o *turnover* de leucina marcada e glutamina e a taxa de aparecimento em indivíduos com AIDS, indivíduos soropositivos para o vírus HIV sem manifestação da doença e um grupo controle de soronegativos para HIV. Estes indivíduos receberam uma infusão intraveno-

sa por 14 horas de ¹⁻¹³C-leucina e ²⁻¹⁵N-glutamina. Foram coletadas amostras de sangue para avaliação da síntese e da quebra protéica e da oxidação de aminoácidos, para determinação da incorporação de [¹³C]-leucina pelo músculo esquelético. O ar expirado foi coletado para analisar o enriquecimento do ¹³CO₂. Os autores concluíram que a perda de massa muscular pelos pacientes com AIDS pode ser causada por deficiência da manutenção do aumento da síntese protéica pelo músculo, enquanto o *turnover* protéico corporal é aumentado. Outro fator que pode contribuir é a não-regulação do metabolismo endógeno de aminoácidos a partir da síntese protéica do músculo, seguindo outros caminhos do metabolismo (oxidação). O aumento plasmático da glutamina nos pacientes com AIDS pode diminuir a síntese de proteína muscular. Este aumento pode interferir na injúria muscular e na degradação acelerada de proteínas; pode também refletir um processo regulador, no qual a síntese de glutamina é aumentada para satisfazer um requerimento elevado desta glutamina por outros tecidos. Estes resultados podem indicar que a glutamina é um nutriente essencial para indivíduos portadores de HIV ou AIDS¹⁵.

O método de avaliação do metabolismo protéico e aminoácido também pode ser realizado através da utilização da ¹⁵N-glicina². Este método foi o primeiro a estimar a dinâmica das proteínas com o auxílio de isótopos estáveis.

Para o estudo da assimilação protéica ou do metabolismo protéico durante a alimentação, é necessária a utilização de proteínas marcadas isotopicamente. Atualmente têm sido realizados estudos com proteínas marcadas com ¹³C-L-leucina. Estas proteínas podem ser utilizadas para avaliar a sua própria assimilação no organismo, em várias doenças, tanto em adultos como em crianças, tais como distúrbios pancreáticos, nos quais se faz a monitoração dos efeitos de medicamentos na assimilação de proteínas, e também para estudar a influência de outros macronutrientes (carboidratos e lipídeos) neste processo de assimilação das proteínas¹⁶.

Estudos da cinética do metabolismo de proteínas durante a alimentação, para avaliar a síntese, oxidação e quebra da proteína corporal total, são os mais adequados para determinar as condições ideais para a utilização da proteína dietética. Estes estudos pressupõem o uso da infusão junto com a administração oral de proteínas marcadas^{16,17,18}.

ESTUDO DO METABOLISMO DE GORDURAS

Outro importante teste realizado pela espectrometria de massa é o teste da digestão de gordura, quantificando o ¹³CO₂ expirado. Até pouco tempo atrás, os métodos utilizados não eram eficazes sendo pouco sensíveis. Em 1981, foi descrito por Ghos et al. o teste do ar expirado

usando isótopos estáveis, chamado “mix de triglicerídeos” (MTG), no qual se mede a atividade da lipase intraduo-denal como um índice da função pancreática exócrina em adultos²⁰. O carbono, originário da gordura (¹³C-mix triglicerídeos: MTG), resultante da digestão, absorção e oxidação, pode ser detectado pelo dióxido de carbono (¹³CO₂) exalado e a quantia recuperada no ar expirado é uma medida indireta da lipólise intestinal. O nome dado ao teste do MTG foi devido à presença de uma molécula de ácido graxo de cadeia longa e uma molécula de ácido graxo de cadeia média (ácido esteárico e ¹³C-ácido octanóico), ligadas ao carbono¹³. O MTG tem algumas vantagens sobre os outros triglicerídeos (trioctanoína e trioléina), que também são usados no estudo do metabolismo de gorduras. O teste do ¹³C - MTG tem sido aplicado em várias situações, tais como em crianças com doença celíaca ou com fibrose cística, na relação exercício físico e composição da dieta, em pacientes adultos com disfunção pancreática, entre outras situações^{21,22}.

ESTUDO DO GASTO ENERGÉTICO UTILIZANDO ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA (²H₂¹⁸O)

Outra utilização importante do isótopo estável é a medida do gasto energético total (GET). Este estudo permite avaliar as necessidades recomendadas de energia dos diferentes nutrientes, em diversas situações patológicas, tais como obesidade, anorexia nervosa, AIDS, entre outras. O método da água duplamente marcada (²H₂¹⁸O), atualmente, é um dos mais eficientes na avaliação do GET. Até a sua padronização, o GET só podia ser realizado na comunidade, por meio de inquérito alimentar e sua comparação com a estabilidade do peso, o que não traz exatidão; do emprego de um calorímetro portátil, sem praticidade; da restrição do voluntário a uma câmara de trocas gasosas fechada ou da reprodução, em laboratório; da atividade física na comunidade, com baixa representatividade. O método da água duplamente marcada representou uma revolução no estudo do metabolismo energético, pois permite que o voluntário permaneça na comunidade, desempenhando suas atividades habituais e, após a ingestão da água marcada com isótopos estáveis, tenha o seu gasto energético total determinado com extrema precisão, pela simples coleta de amostras de urina, não expondo o voluntário a nenhum risco²³.

ESTUDO DO METABOLISMO DE CARBOIDRATOS

VONK et al. (1998) realizaram estudos no metabolismo de carboidratos, utilizando o isótopo ¹³C ligado a lactose, galactose, frutose e amido, e medindo a excreção de ¹³CO₂ no ar expirado. Várias são as situações em que este

estudo é empregado, principalmente em crianças em que se pode fazer a avaliação de desenvolvimento, crescimento e prevenção de distúrbios gastrointestinais. Realiza-se por este método avaliação de tolerância à lactose, digestibilidade do amido e absorção de frutose. O estudo do metabolismo de carboidratos, por meio do teste do ar expirado medindo o ¹³CO₂ expirado após a ingestão do carboidrato alvo ligado ao ¹³C, é fácil de ser aplicado e de utilização clínica. Pode-se aumentar a sua eficiência, utilizando-se o plasma para dosagem do ¹³C ligado à molécula de glicose. Estes métodos substituem testes invasivos aos pacientes e podem diminuir o número de biópsias realizadas, trazendo maior comodidade ao paciente²⁴.

O estudo da taxa de reciclagem de glicose tem sido feito por meio da utilização de isótopos estáveis. Livesey et al. (1998) estimaram a razão do aparecimento sistêmico da glicose hepática e sistêmica, utilizando a infusão preliminar do isótopo D-[6,6²H₂]-glicose e, após duas horas, uma dose oral do isótopo D-[¹³C₃]-glicose. Neste estudo, os autores puderam concluir que a aplicação de isótopos estáveis é uma alternativa segura, eficiente e relevante para a avaliação fisiológica da glicose em humanos, principalmente quando comparada aos estudos em que se utilizam radioisótopos²⁵.

ESTUDO CINÉTICO E METABÓLICO DE VITAMINAS

Nos últimos anos, vários métodos têm sido descritos para avaliar a biodisponibilidade das vitaminas, tanto as lipossolúveis como as hidrossolúveis. Dentre esses métodos, o que tem sido mais investigado para estudo cinético e metabólico destas vitaminas é o método que utiliza a técnica por cromatografia gasosa, acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)⁷.

Os estudos da biodisponibilidade do ácido fólico têm possibilitado a prevenção de várias doenças, tais como o controle da concentração da homocisteína, com consequente redução de riscos cardiovasculares, e a redução de defeitos na formação do tubo neural de embriões. O desenvolvimento de técnicas utilizando isótopos estáveis de ácido fólico tem beneficiado o avanço do estudo da absorção e do metabolismo desse importante nutriente, assim como a relação composição da dieta / biodisponibilidade de folato²⁶⁻²⁹.

A biodisponibilidade das formas dietéticas da vitamina B₆ ocorre em função de sua extensa absorção e da conversão metabólica à forma de coenzima primária piridoxal fosfato. A 5-piridoxina b-d-glicosídeo (PN-glicosídeo) é a forma de vitamina B₆, de maior ocorrência em vegetais, frutas e cereais³⁰. Nakano et al. (1997)³¹ avaliaram a biodisponibilidade da PN-glicosídeo, por meio da administração em indivíduos saudáveis dos isótopos estáveis da

piridoxina deuterada ($[^2\text{H}_2]\text{PN}$ ou da $[^2\text{H}_2]\text{PN}$ -glicosídeo). Este estudo permitiu a análise do tempo de curso da utilização metabólica da piridoxina e da piridoxina glicosídeo e algum efeito antagonista desta última. Outras vitaminas hidrossolúveis e seus derivados podem ser analisados por GC-MS, assim como a cobalamina (B_{12}) e seus análogos^{32,33} e a vitamina C³⁴. Dentre as vitaminas lipossolúveis, tem sido divulgado o estudo cinético das vitaminas A, E e b-caroteno³⁵⁻³⁷.

A vitamina A é um nutriente essencial para humanos e está envolvida em importantes funções fisiológicas. Sua absorção, seu transporte, armazenamento e metabolismo são muito regulados, o que envolve um grande número de proteínas específicas e enzimas. Tem sido demonstrada em alguns trabalhos a utilização dos isótopos estáveis no estudo da cinética plasmática da vitamina A. Estes estudos utilizam o isótopo estável palmitato de retinila ligado ao carbono 13 (^{13}C -palmitato de retinila), assim como o retinol deuterado (d_4 -acetato de retinila), mostrando resultados favoráveis na análise em GC-MS³⁸⁻⁴⁰.

A determinação da dinâmica do b-caroteno individualmente em humanos tem sido avaliada e os isótopos estáveis do β -caroteno podem ser aplicados para determinar a razão de conversão a retinol ou vitamina A^{36, 41-44}.

A deficiência clínica e bioquímica da vitamina E pode ocorrer em humanos, como resultado da má absorção e do transporte inadequado. Em pacientes com síndrome do intestino curto, acontece a deficiência de vitamina E. Os valores plasmáticos não se alteram quando é administrada preparação de alfa-tocoferol intramuscular. A forma hidrossolúvel tocoferil succinato polietilenoglicol (TPGS) pode ser uma efetiva suplementação em pacientes com a síndrome do intestino curto. Dessa forma, Traber et al. (1994) realizaram estudo com o isótopo do TPGS ligado ao deutério em paciente acometido com a síndrome e mediram o aparecimento desse tocoferil ligado ao deutério nas lipoproteínas plasmáticas, assim como o tocoferol no plasma por GC-MS. Os resultados obtidos foram favoráveis com a suplementação, assim como o método utilizado foi eficiente e mostrou boa reprodutibilidade⁴⁵.

ESTUDOS DE ABSORÇÃO DE MINERAIS

Há inúmeros métodos para avaliação das necessidades de minerais nas crianças. Uma abordagem importante para acessar as necessidades é determinar a quantidade de minerais absorvidos e retidos pelas crianças no consumo de dietas, em várias administrações. Isso pode ser feito por vários métodos, inclusive pelos métodos de isótopos estáveis⁴⁶.

Técnicas de isótopos estáveis podem facilitar a pesquisa nas necessidades minerais de crianças, conforme se descreve a seguir: 1) relacionando metabolismo mineral com crescimento e desenvolvimento puberal; 2) avaliando interações minerais nutricionais; 3) avaliando os efeitos de doenças agudas e crônicas na absorção e no metabolismo; 4) avaliando as necessidades do lactente e de crianças alimentadas por fórmulas para considerar a administração ótima de minerais nessas fórmulas⁴⁶.

Métodos baseados em isótopos estáveis também ajudam a acessar a biodisponibilidade da fortificação com ferro, zinco e cálcio a partir de vários tipos de alimentos e para guiar decisões políticas globais⁴⁷.

Estudos usando isótopos estáveis de ferro estimam diretamente a fração do isótopo que está incorporado à célula vermelha do sangue a partir de uma dose administrada por via oral. Uma amostra de sangue é obtida 14-28 dias após a administração do isótopo; em seguida, estima-se o enriquecimento dos isótopos administrados^{46,47}.

O uso de isótopos de ferro como marcadores constituem ferramenta útil para explorar a natureza desses minerais e é seguro para ser usado em crianças, pois não necessita de doses endovenosas.

CONCLUSÃO

Os isótopos estáveis, por serem inócuos ao ser humano, em completa oposição aos radioativos, podem ser utilizados em todos os grupos de pessoas, incluindo recém-nascidos e mulheres grávidas, entre outros. A aplicabilidade destes isótopos como coadjuvante no diagnóstico clínico, assim como o estudo de vias metabólicas, tem sido cada vez maior, pois envolve técnicas não-invasivas, eficientes e com boa reprodutibilidade.

ABSTRACT

Mass spectrometry has been frequently applied in clinical medicine and research, especially when man is the object of experiment. With the current technology, different aspects of the intermediary metabolism may be studied. Stable isotopes are considered innocuous to the human being. Therefore, it is possible to use them in pregnant women and children. On the other hand, with the increasing availability of stable isotopes and laboratories that work with mass spectrometry technique, its use is also spreading among us. The use of mass spectrometry allows the study, for example, of protein synthesis capacity, amino acid metabolism, fat absorption defects, vitamin kinetics, and the presence of *Helicobacter pylori*.

Key words: Mass Spectrometry; Stable isotope; Clinical application; Nutrition

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Koletzko B, Sauerwald T, Demmelmair H. Safety of stable isotope use. *Eur J Pediatr* 1997; 156 (suppl. 1):S12-7.
- 2- Marchini JS, Basile Filho A, Vannucchi H, Darmaun D, Krempf M. Utilização de espectrometria de massa para o estudo do metabolismo protéico e aminoacídico, em Medicina. *Medicina (Ribeirão Preto)* 1997; 30(4):494-507.
- 3- Matwiyoff NA, Ott DG. Stable isotope tracers in the life sciences and medicine. *Science* 1973; 181 (4105):1125-33.
- 4- Bier DM. Stable isotopes in biosciences, their measurement and models for amino acid metabolism. *Eur J Pediatr* 1997; 156 (suppl. 1):S2-8.
- 5- Crews HM, Mellow FA. Mass spectrometry: general considerations. In: Mellow FA, Sandström B. *Stable isotopes in human nutrition*. London: Academic Press; 1996.
- 6- Baerlocher K, Hoffmann GF, Koletzko B, Leonard JV, Przyrembel H. Stable isotopes in inborn errors of metabolism. *Eur J Pediatr* 1997; 156 (suppl. 1):S1.
- 7- Jackson MJ. The assessment of bioavailability of micronutrients: Introduction. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51 (suppl. 1):S1-2.
- 8- Namera A, Yashiki M, Okada K, Iwasaki Y, Ohtani M, Kojima T. Automated preparation and analysis of barbiturates in human urine using the combined system of prepStation gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B* 1998; 706(2):253-9.
- 9- Vierhapper H, Nowotny P, Waldhäusli W. Treatment with growth hormone suppresses cortisol production in man. *Metabolism* 1998; 47 (11):1376-8.
- 10- Dizdaroglu M. Gas Chromatography-mass spectrometry of free radical-induced products of pyrimidines and purines in DNA. *Meth Enzymol* 1990; 193:842-57.
- 11- Rasmussen K. Solid-phase sample extraction for rapid determination of methylmalonic acid in serum and urine by a stable-isotope-dilution method. *Clin Chem* 1989; 35 (2):260-4.
- 12- Volpi E, Ferrando AA, Yeckel CW, Tipton KD, Wolfe RR. Exogenous amino acids stimulate net muscle protein synthesis in the elderly. *J Clin Invest* 1998; 101(9):2000-7.
- 13- Borel MJ, Buchowski MS, Turner EA, Peerler BB, Goldstein RE, Flakoll PJ. Alterations in basal nutrient metabolism increase resting energy expenditure in sickle cell disease. *Am J Physiol* 1998; 274 (2 pt 1):E357-64.
- 14- Hasten DL, Morris GS, Ramanadham S, Yarasheski KE. Isolation of human skeletal muscle myosin heavy chain and actin for measurement of fractional synthesis rates. *Am J Physiol* 1998; 275 (6 PT 1):E1092-9.
- 15- Yarasheski KE, Zachwieja JJ, Gischler J, Crowley J, Horgan MM, Powderly WG. Increased plasma Gln and Leu Ra and inappropriately low muscle protein synthesis rate in AIDS wasting. *Am J Physiol* 1998; 275 (4 Pt 1):E577-83.
- 16- Ghoss Y, Beaufrère B. ¹³C protein breath tests. *Gut* 1998; 43 (suppl. 3):S23-4.
- 17- Millward DJ. Metabolic demands for amino acids and human dietary requirement: Millward and Rivers (1988) revisited. *J Nutr* 1998; 128(12):2563S-76S.
- 18- Rittler P, Demmelmair H, Kaletz B, Schildberg FW, Hartl W. Determination of protein synthesis in human ileum in situ by continuous [1-¹³C] leucine infusion. *Am J Physiol* 2000; 278:E634-8.
- 19- Dangin M, Boire Y, Garcia-rodenas C, Gachon P, Fauquant J, Callier P et al. The digestion rate of protein is an independent regulating factor of postprandial protein retention. *Am J Physiol* 2001; 280:E340-8.
- 20- Ghoss YF, Maes BD, Geypens BJ, Mys G, Hielle MI, Rutgeerts PJ, Vantrappen G. Measurement of gastric emptying rate of solids by means of a carbon labelled octanoic acid breath test. *Gastroenterology* 1993; 104(6):164-7.
- 21- Hickner RC, Fisher JS, Kohrt WM. Regional differences in interstitial glycerol concentration in subcutaneous adipose tissue of women. *Am J Physiol* 1997; 273(5 pt 1):E1033-8.
- 22- Weaver L.T, Amarri S, Swart GR. ¹³C mixed triglyceride breath test. *Gut* 1998; 43 (suppl 3):S13-9.
- 23- Westertep KR, Wouters L., Van Marken Lichtenbelt WD. The Mastrichd protocol for measurement of body composition and energy expenditure with labeled water. *Obes Res* 1995; 3 (suppl 1):49-57.
- 24- Vonk RJ. Application of stable isotopes in clinical medicine BIOMED1-Introduction. *Gut* 1998; 43 (suppl 3):S1.
- 25- Livesey G, Wilson PDG, Dainty JR, Brown JC, Faulks RM, Roe MA et al. Simultaneous time-varying systemic appearance of oral and hepatic glucose in adults monitored with stable isotopes. *Am J Physiol* 1998; 275 (4 pt 1):E717-28.
- 26- Pfeiffer CM, Rogers LM, Bailey LB, Gregory JF. Absorption of folate from fortified cereal-grain products and of supplemental folate consumed with or without food determined by using a dual-label stable-isotope protocol. *Am J Clin Nutr* 1997; 66(6):1388-97.
- 27- Rogers LM, Pfeiffer CM, Bailey LB, Gregory JF. A dual-label stable-isotopic protocol is suitable for determination of folate bioavailability in humans: Evaluation of urinary excretion and plasma folate kinetics of intravenous and oral doses of [¹³C5] and [2H2]-folic acid. *J Nutr* 1997; 127(12):2321-7.
- 28- Santhosh-Kumar CR, Deutsch JC, Hassel KL, Kolhouse NM, Kolhouse JF. Quantitation of red blood cell folates by stable isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry utilizing a folate internal standard. *Anal Biochem* 1995; 225(1):1-9.
- 29- Stites TE, Bailey LB, Scott KC, Toth JP, Fisher WP, Gregory JF. Kinetic modeling of folate metabolism through use of chronic administration of deuterium-labeled folic acid in men. *Am J Clin Nutr* 1997; 65(1):53-60.
- 30- Biemann K. Utility of exact mass measurements. *Meth Enzymol* 1990; 193:295-305.
- 31- Nakano H, McMahan LG, Gregory JF. Pyridoxine-5'-b-d-glucoside exhibits incomplete bioavailability as a source of vitamin B6 and partially inhibits the utilization of co-ingested pyridoxine in humans. *J Nutr* 1997; 127(18):1508-13.
- 32- MacCann MT, Thompson MM, Gueron IC, Lemieux B, Giguere R, Tuchman M. Methylmalonic acid quantification by stable isotope dilution gas chromatography-mass

- spectrometry from filter paper urine samples. *Clin Chem* 1996; 42 (6):910-4.
- 33- Sundin DP, Allen RH. Analysis of the nucleoside moiety of cobalamin and cobalamin analogues using gas chromatography-mass spectrometry. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298 (2):658-66.
- 34- Podmore ID, Griffiths HR, Herbert KE, Mistry N, Mistry P, Lunec J. Vitamin C exhibits pro-oxidant properties. *Nature* 1998; (6676) 392:559.
- 35- Cohn W. Bioavailability of vitamin E. *Eur J Clin Nutr* 1997; 51 (suppl. 1):S80-5.
- 36- Dueker SR, Mercer RS, Jones AD, Clifford AJ. Ion trap mass spectrometry for kinetic studies of stable isotope labeled vitamin A at low enrichments. *Anal Chem* 1998; 70(7):1369-74.
- 37- Lieber DC, Burr JA, Philips L, Ham AJ. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of vitamin E and its oxidation products. *Anal Biochem* 1996; 236(1):27-34.
- 38- Dueker SR, Lunetta JM, Jones AD, Clifford AJ. Solid-phase extraction protocol for isolating retinol-d4 and retinol from plasma for parallel processing for epidemiological studies. *Clin Chem* 1993; 39 (11):2318-22.
- 39- Handelman GJ, Haskell MJ, Jones AD, Clifford AJ. An improved protocol for determining ratios of retinol-d4 to retinol isolated from human plasma. *Anal Chem* 1993; 65(15):2024-8.
- 40- Reinersdorff DV, Bush E, Liberato DJ. Plasma Kinetics of vitamin A in humans after a single dose of [8,9,19-13C] retinyl palmitate. *J Lipid Res* 1996; 37(9):1875-85.
- 41- Dueker SR, Jones AD, Smith GM, Clifford AJ. Stable isotope methods in humans utilizing tandem mass spectrometry and high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1994; 66(23):4177-85.
- 42- Novotny JA, Dueker SR, Zech LA, Clifford AJ. Compartmental analysis of the dynamics of b-carotene metabolism in an adult volunteer. *J Lipid Res* 1995; 36(8):1825-38.
- 43- Parker RS, Brenna JT, Swanson JE, Goodman KJ, Marmor B. Assessing metabolism of b-[13C]-carotene using high precision isotope ratio mass spectrometry. *Meth Enzymol* 1997; 282:130-40.
- 44- Tang G, Andrien BA, Dolnikowski G, Russel RM. Atmospheric pressure chemical ionization and electron capture negative chemical ionization mass spectrometry in studying b-carotene conversion to retinol in humans. *Meth Enzymol* 1997; 282:140-53.
- 45- Traber MG, Schiano TD, Steephen AC, Kayden HJ, Shike M. Efficacy of water-soluble vitamin E in the treatment of vitamin E malabsorption in short-bowel syndrome. *Am J Clin Nutr* 1994; 59(6):1270-4.
- 46- Abrams SA. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. *Am J Clin Nutr* 1999; 70(1):955-64.
- 47- Griffin I. Using stable isotopes and isotope ratio mass spectrometry to study mineral metabolism in human. *J Anal At Spectrom*, 2002; 4:1-9.