

JANUÁRIA FONSECA MATOS

ANEMIAS
MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS:
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2007

JANUÁRIA FONSECA MATOS

ANEMIAS
MICROCÍTICAS E HIPOCRÔMICAS:
DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria das Graças Carvalho

Co-Orientadora: Prof^a Dr^a Luci Maria Sant'Ana Dusse

Belo Horizonte
Faculdade de Farmácia da UFMG
2007

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Pedro e Maria Lúcia,
que pelos seus exemplos de vida me ensinaram que
é possível a realização de sonhos a partir da dignidade,
honestidade e perseverança.

Às minhas irmãs, Jordânia e Júnia,
que sempre me apoiaram em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que pela sua presença e força, tornou possível a conclusão de mais uma etapa de minha vida;

À Prof^a. Dr^a. Maria das Graças Carvalho, pela brilhante orientação do projeto e pelos constantes ensinamentos que contribuíram de forma marcante para minha vida profissional e pessoal;

À Prof^a. Dr^a. Luci Maria Sant'Ana Dusse pela co-orientação do projeto, pelo incentivo e pelo carinho;

À Mônica de F. Ferreira e Rachel Versiani B. Stubbert pela constante disponibilidade, empenho e fundamental colaboração em todas as etapas do projeto;

Aos demais funcionários do Laboratório de Patologia do Hospital Governador Israel Pinheiro pela amizade e pela importante contribuição na coleta de material biológico e realização dos exames;

A todos os estagiários de Análises Clínicas que colaboraram na coleta das amostras especialmente ao Fabrício S. Gomes, Milena B. Oliveira e Leonardo Antônio R. Batalho que não mediram esforços para realização desta etapa do trabalho;

Ao Prof. Dr. Lauro de Mello Vieira e Prof. Dr. José Roberto de Faria pelas importantes sugestões para o melhor desenvolvimento do trabalho;

À Geralda de Fátima G. Lages, obrigada pelo apoio e colaboração;

Ao Prof. Geraldo Tadeu Generoso pela amizade e apoio;

Aos alunos de iniciação científica, Felipe Carlos B. Souza e Heriely B. Ribeiro pela colaboração e incentivo;

Aos amigos da pós graduação, Sabrina, Caleb, Adriano, Renata, Leonardo, Natália pela contribuição, apoio e incentivo;

Ao Wendel pelo constante apoio, amor e principalmente pelo estímulo durante todas as etapas desta conquista;

Aos amigos do Laboratório da Prefeitura Municipal de Divinópolis pelo apoio oferecido no decorrer do trabalho;

A todos os meus amigos que estiveram presentes com seu carinho e incentivo nesta importante etapa da minha vida, especialmente Cristiane, Anna Paula Batschaeur, Helenise, Queine, Tedy, Elisete e Daniela;

À Graça e Expedito pelo carinho, amizade e incentivo;

À Prof^ª. Ângela Maria Quintão Lana, e também ao Ricardo Vilela e Fernanda Alves pela grande colaboração na análise estatística dos resultados;

À funcionária da Secretaria de Pós Graduação, Rosemary Alves Guimarães, pela constante disponibilidade;

À bibliotecária Carmem Maria C. Durães da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela atenção na revisão das referências bibliográficas;

Aos pacientes pela imprescindível participação neste estudo;

A todos os funcionários da Faculdade de Farmácia da UFMG que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Definição de anemia	16
1.2 Mecanismos da anemia	16
1.3 Sinais e sintomas da anemia	17
1.4 Classificação das anemias	17
1.4.1 Classificação fisiopatológica	17
1.4.2 Classificação morfológica	18
1.4.3 Classificação clínica.....	19
1.5 Avaliação clínica da anemia	19
1.6 Avaliação laboratorial da anemia.....	19
1.7 Anemias microcíticas e hipocrômicas	20
1.7.1 Anemia ferropriva	20
1.7.2 Talassemias.....	32
1.7.3 Anemias por doenças crônicas.....	43
1.7.4 Índices para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor.....	53
1.7.5 Plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e índice de anisocitose plaquetária (PDW) nas anemias microcíticas e hipocrômicas.....	56
1.7.6 Alterações morfológicas das hemácias no filme sanguíneo nas anemias microcíticas e hipocrômicas.....	60
2 JUSTIFICATIVA	62
3 OBJETIVOS	65
3.1 Objetivo geral.....	66
3.2 Objetivos específicos	66
4 MATERIAL E MÉTODOS	67
4.1 Casuística	68
4.1.1 Classificação dos pacientes de acordo com a anemia microcítica e hipocrômica	68
4.1.1.1 Anemia ferropriva.....	68
4.1.1.2 Anemia da doença crônica	68
4.1.1.3 β Talassemia menor	68
4.2 Amostra biológica	69
4.3 Aplicação dos índices da literatura	70
4.4 Análise estatística.....	71

5 RESULTADOS	72
5.1 Caracterização dos pacientes.....	73
5.2 Análise de parâmetros hematimétricos.....	75
5.3 Tentativa de obtenção de um novo índice para a discriminação entre anemia ferropriva e β talassemia menor	87
5.3.1 Tentativa de obtenção de índices para anemia ferropriva, anemia de doença crônica e β talassemia menor	90
5.4 Análise de vários índices na discriminação entre anemia ferropriva e β talassemia menor.....	91
5.5 Variação do valor de <i>cut-off</i> para o Índice de Green & King	99
5.6 Análise microscópica do filme sanguíneo	100
6 DISCUSSÃO	102
6.1 Considerações gerais	103
6.2 Parâmetros do hemograma	106
6.3 Potencial aplicação de índices na discriminação de anemias microcíticas e hipocrômicas.....	111
6.4 Plaquetas e índices plaquetários	118
6.5 Análise de filme sanguíneo: aspectos morfológicos	120
6.6 Limitações do estudo	121
6.7 Perspectivas futuras de novos estudos	123
7 CONCLUSÕES	124
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	126
9 APÊNDICE	145
10 ANEXO.....	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fórmulas e valores de <i>cut-off</i> para seis índices de discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor.	55
Tabela 2 - Caracterização dos pacientes atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) com relação à média de idade e ao sexo.	74
Tabela 3 - Caracterização dos pacientes atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) quanto ao local de procedência.	74
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de anemia ferropriva, anemia de doença crônica e β talassemia menor atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG).	76
Tabela 5 - Equações para diferenciação entre anemia ferropriva, anemia de doença crônica e β talassemia menor.	90
Tabela 6 - Pacientes corretamente diagnosticados pelos índices testados.	92
Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e eficiência de alguns índices na discriminação entre anemia ferropriva e β talassemia menor.	97
Tabela 8 - Valores de áreas sob a curva ROC e índice de Youden para as funções discriminantes testadas.	98
Tabela 9 - Alterações morfológicas dos eritrócitos e número de pacientes com o respectivo valor percentual.	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Um resumo das síndromes clínicas chaves e a fisiopatologia da α e β talassemia.....	36
Figura 2 - Fatores fisiopatológicos para o desenvolvimento da ADC.....	50
Figura 3 - Número de hemácias na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	78
Figura 4 - Valores de hemoglobina na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	79
Figura 5 - Volume corpuscular médio na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor.....	80
Figura 6 - Hemoglobina corpuscular média na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor.....	81
Figura 7 - Concentração de hemoglobina corpuscular média na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	82
Figura 8 - Anisocitose eritrocitária na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor.....	83
Figura 9 - Número de plaquetas na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	84
Figura 10 - Volume plaquetário médio na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	85
Figura 11 - Anisocitose plaquetária na anemia ferropriva, na anemia de doença crônica e na β talassemia menor	86
Figura 12 - Curvas ROC para o Índice de Green & King e o Novo Índice calculado.....	89

LISTA DE ABREVIATURAS

ADC - anemia da doença crônica

AF - anemia ferropriva

ATP - trifosfato de adenosina

BFU-e - unidade formadora de colônia eritróide explosiva

CFU-e - unidade formadora de colônia eritróide

CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média

CPE - células precursoras eritróides

CTLF - capacidade de ligação total do ferro

Curva ROC - *Receiver Operator Characteristic Curve*

DcytB - redutase férrica (citocromo B duodenal)

DMT-1 - transportador de metal divalente

DNA - ácido desoxirribonucléico

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

eIF2 - fator 2 de iniciação eucariótica

eIF2 α - subunidade α do fator 2 de iniciação eucariótica

EPO - eritropoetina

GM-CSF - fator estimulante de colônias granulocítica-monocítica

Hb - hemoglobina

HbA - hemoglobina A

HbA₂ - hemoglobina A₂

HbF - hemoglobina fetal

HbH - hemoglobina H

HCM - hemoglobina corpuscular média

HIV - vírus da imunodeficiência humana

HLA - antígeno leucocitário humano

Hm - hemácias

HRI - inibidor da síntese protéica heme-regulado

Ht - hematócrito

IFN- γ - interferon gama

IGK - Índice de Green & King
IL-1 - interleucina 1
IL-4 - interleucina 4
IL-6 - interleucina 6
IL-10 - interleucina 10
IL-11 - interleucina 11
IL-13 - interleucina 13
IM - Índice de Mentzer
IPSEMG - Instituto de Previdência Social do Estado de Minas Gerais
IRC - insuficiência renal crônica
IRDW - Índice do RDW
IRE - elemento responsivo ao ferro
IREG1 - ferroportina 1
IRP - proteína regulatória do ferro
IST - índice de saturação de transferrina
mRNA - ácido ribonucléico mensageiro
NI - Novo Índice
NK - células matadoras naturais
NO - óxido nítrico
PCR - proteína C reativa
PDW - índice de anisocitose plaquetária
RDW - índice de anisocitose eritrocitária
S - Índice de Srivastava
SL - Índice de Shine e Lal
SRE - sistema reticuloendotelial
sTfR - receptor sérico de transferrina
SUS - Sistema Único de Saúde
TfR - receptor de transferrina
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
TPO - trombopoetina
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais

VCM - volume corpuscular médio
VHS - velocidade de sedimentação eritrocitária
VPM - volume plaquetário médio
VPN - valor preditivo negativo
VPP - valor preditivo positivo
ZPP - zinco protoporfirina
 α_1 -AT - α_1 -antitripsina
 α_2 - cadeias alfa globínicas
 β -Tal - β talassemia menor
 β_2 - cadeias beta globínicas
 γ_2 - cadeias gama globínicas
 γ_4 - hemoglobina Bart's

RESUMO

As anemias microcíticas e hipocrômicas atingem uma grande parcela da população mundial. Entre as mais comuns em nosso meio podem ser citadas a anemia ferropriva, anemia de doença crônica e talassemia menor. O correto diagnóstico destas anemias é clinicamente importante, uma vez que cada uma delas apresenta diferentes patogênese, tratamento e prognóstico. Atualmente, o diagnóstico destas doenças é realizado através dos exames chamados padrão-ouro, muitas vezes inacessíveis a uma população menos favorecida. O objetivo principal deste estudo foi caracterizar as anemias microcíticas e hipocrômicas quanto ao metabolismo do ferro e perfil hemoglobínico em um grupo de 274 pacientes apresentando um quadro de anemia (hemoglobina inferior a 12,0 g/dL para mulheres e 13,0 g/dL para homens) e microcitose (VCM inferior a 80 fL) atendidos no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG), visando a simplificação do diagnóstico diferencial. Os pacientes foram caracterizados ainda quanto à idade, sexo e local de procedência. Além disso, vários parâmetros obtidos do hemograma e índices discriminantes descritos na literatura para efetuar a diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas foram testados. ANOVA, Kruskal-Wallis, curva ROC, índice de Youden e função discriminante de Fisher foram utilizados para a análise estatística. Na população investigada neste trabalho foi observada a maior prevalência da anemia ferropriva seguida pela anemia de doença crônica. O parâmetro que mostrou maior eficiência na diferenciação entre os três grupos foi o número de hemácias (Hm). Ao contrário, o índice de anisocitose eritrocitária (RDW) mostrou valor limitado na discriminação das várias anemias microcíticas. Entre as fórmulas discriminantes já citadas na literatura, o Índice de Green & King apresentou a melhor acurácia diagnóstica. Contudo, uma nova fórmula discriminante desenvolvida neste trabalho, denominada Novo Índice (NI), mostrou um desempenho ainda superior ao Índice de Green & King apresentando maior eficiência dentre os índices testados. Os parâmetros hematimétricos e índices não possibilitam um diagnóstico definitivo das anemias, porém, podem ser úteis como ferramenta de *screening* evitando gastos adicionais com exames confirmatórios e um tratamento inapropriado.

Palavras-chave: anemia ferropriva, anemia de doença crônica, talassemia menor

ABSTRACT

Microcytic and hypochromic anemias affect several people in worldwide. In our population, the most common microcytic and hypochromic anemias are iron deficiency anemia, anemia of chronic disease and thalassemia trait. Differentiation of these microcytic anemias is of clinical importance because each one has entirely different cause, pathogenesis, prognosis and treatment. Currently, diagnosis of such anemias is defined by gold standard tests, frequently not available to everybody. The main objective of this study was to characterize the microcytic and hypochromic anemias for iron metabolism and hemoglobin profile in a group of 274 patients showing hemoglobin level below to 12,0 g/dL for women and 13,0 g/dL for men and mean corpuscular volume (MCV) below to 80 fL, selected from the Clinical Pathology Service, Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG). The patients was characterized by age, sex and origin. Besides, several hematological parameters and discriminants indexes were tested for differentiation of the microcytic and hypochromic anemias. ANOVA, Kruskal-Wallis, ROC curve, Youden's Index and Fisher's discriminant function were applied for statistical analyses. In investigated population, iron deficiency anemia was the most prevalent followed by anemia of chronic disease. The parameter showed to be more efficient for differentiating the three groups was red blood cells number. Contrarily, red blood cell distribution width (RDW) presented a limited value in differentiating microcytic and hypochromic anemias. Among the discriminant functions already established, Index of Green and King showed the best diagnostic accuracy. However, in this study, a new index (NI) has been developed which showed performance superior to Index of Green and King. The hematimetric parameters and discriminant indexes do not allow a definite diagnosis of the anemias but they may be useful as a screening tool preventing additional expenses with confirmatory tests and a inappropriate treatment.

Key words: iron deficiency anemia, anemia of chronic disease, thalassemia minor.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Definição de anemia

Tradicionalmente, a anemia é definida como valores diminuídos de hematócrito (Ht) e hemoglobina (Hb), sendo para homens, <39% e <13 g/dL e, para mulheres, <36% e <12 g/dL, respectivamente. Estas medidas, entretanto, não devem ser usadas como fatores isolados, mas em combinação com avaliação clínica e de sinais vitais (GREENBURG, 1996; WHO, 2001).

Pesquisadores como Carley (2003), definem anemia como uma condição patológica na qual existe uma diminuição na massa de células sanguíneas vermelhas ou uma diminuição da quantidade de hemoglobina.

Uma definição neoclássica de anemia seria uma massa de células sanguíneas vermelhas circulantes (Hm) diminuída (GREENBURG, 1996; QUINTÓ *et al.*, 2006); definição esta, que leva em consideração o volume vascular e a distribuição de fluidos no organismo. Contudo, há uma inconveniência para medir a massa de hemácias pois as técnicas atuais de medida a correlacionam com o volume plasmático e levam, com isso, a um resultado subestimado desta massa quando o volume plasmático está aumentado, como visto em pacientes com insuficiência cardíaca congestiva, gravidez e sobrecarga iatrogênica de fluido. De maneira inversa, uma medida superestimada do número de hemácias ocorre no paciente desidratado ou usando diuréticos. Então, a mais razoável definição de anemia estaria relacionada à perda de volume sanguíneo, pois neste caso há perda de ambos, volume plasmático e massa de hemácias (GREENBURG, 1996).

Outra definição de anemia é aquela que reflete a perfusão tecidual e o uso do oxigênio no organismo. Neste caso, a anemia é definida como uma diminuição no suprimento de oxigênio aos tecidos levando a um quadro de hipóxia (RENZI *et al.*, 1993; WHO, 2007).

1.2 Mecanismos da anemia

Inúmeros mecanismos importantes são atribuídos como causadores de anemia sendo que todos levam a uma capacidade diminuída de carrear oxigênio e produzem anemia aguda ou crônica. Dentre estes mecanismos estão a perda de sangue causada

por trauma, hemorragia gastrointestinal aguda ou crônica, perda sanguínea intraoperatória, a deficiência do ferro, uma doença ou inflamação crônica, hemólise, falência da medula óssea e megaloblastose (GREENBURG, 1996).

1.3 Sinais e sintomas da anemia

As manifestações clínicas da anemia dependem do grau e rapidez das mudanças na massa de células sanguíneas vermelhas, da diminuição da capacidade de carrear oxigênio do sangue, dos sinais e sintomas da doença de base e da capacidade de compensação cardiovascular e ventilatória. Fadiga, síncope, dispnéia, *angina pectoris* e isquemia cerebral transiente ocorrem devido ao aporte diminuído de oxigênio aos tecidos. A palidez e hipotensão postural se devem à diminuição da massa de células sanguíneas vermelhas. Palpitações, insuficiência cardíaca congestiva, taquicardia e ruído na ejeção sistólica são devidos à potência cardíaca aumentada (ROSNER & GRUNWALD, 1997).

1.4 Classificação das anemias

A anemia pode ser classificada considerando a fisiopatologia, a morfologia e a clínica.

1.4.1 Classificação fisiopatológica

Esta classificação leva em consideração a origem e o mecanismo fisiopatológico da anemia. Sob este aspecto, a anemia pode se desenvolver devido a uma diminuição das células vermelhas resultante de perda sanguínea aguda ou crônica, taxa de destruição aumentada dos eritrócitos ou diminuição de sua produção (OLIVEIRA & NETO, 2004).

A anemia resultante da diminuição da produção ocorre quando existe um distúrbio da proliferação e da distribuição das células-tronco. Tal situação é vista na anemia hipoplástica ou aplástica, anemia da falência renal, algumas endocrinopatias e infiltração da medula óssea por leucemia ou metástase tumoral (ROSNER &

GRUNWALD, 1997). Fazem parte deste grupo também as anemias carenciais por falta de ferro, ácido fólico, vitamina B₁₂, vitamina B₆, proteínas, hormônio tireoidiano e eritropoetina (EPO) (ROSNER & GRUNWALD, 1997; OLIVEIRA & NETO, 2004).

No caso das anemias por aumento da destruição de eritrócitos há uma diminuição da vida média desses na circulação. Tais anemias são denominadas anemias hemolíticas e resultam de mecanismos hereditários e adquiridos. Os mecanismos hereditários surgem devido a mutações ou deleções e geram algum defeito intrínseco no eritrócito, seja na membrana, na molécula de hemoglobina ou nas enzimas. São exemplos de doenças hereditárias que causam anemia devido a anormalidades estruturais dos eritrócitos, a esferocitose, eliptocitose, anemia falciforme e talassemia. Já os mecanismos adquiridos se devem a anormalidades extrínsecas aos eritrócitos como o que ocorre nas doenças auto-imunes, transfusões de sangue e na incompatibilidade materno fetal onde há destruição de células vermelhas mediada por anticorpos. As doenças desencadeadas por microrganismos e outras condições também podem provocar anemia hemolítica, incluindo a coagulação intravascular disseminada (OLIVEIRA & NETO, 2004).

1.4.2 Classificação morfológica

A descrição da morfologia celular é um método para a classificação da anemia. Tal abordagem tem como parâmetros principais o conteúdo de hemoglobina das hemácias (eritrócitos normocrômicos ou hipocrômicos) e o seu tamanho (microcíticos, normocíticos ou macrocíticos) (CAVALIERE, 2004). Assim, a classificação morfológica divide as anemias em três grandes grupos, a saber: anemias microcíticas e hipocrômicas (eritrócitos de pequeno tamanho e com baixo conteúdo de hemoglobina); anemias normocíticas e normocrômicas (tamanho e conteúdo médios de hemoglobina normais) e anemias macrocíticas (eritrócitos maiores com concentração interna de hemoglobina normal) (OLIVEIRA & NETO, 2004; COYER, 2005).

1.4.3 Classificação clínica

Esta classificação se baseia na velocidade de instalação dos sintomas da anemia (palidez, fraqueza, palpitação, etc) e leva à divisão das anemias em agudas (processo de instalação rápida) e crônicas (anemias de longa duração) (OLIVEIRA & NETO, 2004).

1.5 Avaliação clínica da anemia

A avaliação clínica consta de um exame físico em busca de alterações tais como hepatoesplenomegalia, glossite, ginecomastia, perda de peso marcante, sintomas gastrointestinais, febre, linfadenopatia generalizada e equimoses que podem ajudar a diagnosticar a possível causa da anemia. Além do exame físico é necessária a obtenção de informações sobre a etnia e raça do paciente, história familiar, uso de medicamentos, hábitos e atividades ocupacionais que podem auxiliar no esclarecimento da causa da anemia (ROSNER & GRUNWALD, 1997).

1.6 Avaliação laboratorial da anemia

Os testes laboratoriais iniciais para detecção da anemia após um exame clínico usualmente incluem medidas de hemoglobina, hematócrito, contagem de eritrócitos e reticulócitos, índices hematimétricos e a análise microscópica do filme sanguíneo. Os índices hematimétricos incluem o volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) e índice de anisocitose eritrocitária (RDW). Tais índices fornecem informação sobre os eritrócitos que auxilia o diagnóstico da causa de base da anemia (WONG *et al.*, 1996). O filme sanguíneo, juntamente com os valores dos índices hematimétricos permitem a classificação da morfologia celular. Como já citado anteriormente, a célula sanguínea vermelha pode ser descrita como microcítica, normocítica ou macrocítica, (CAVALIERE, 2004), além de poder ser normocrômica ou hipocrômica.

Além disso, várias dosagens bioquímicas podem ser feitas para o diagnóstico correto das anemias, tais como, concentração de ferritina sérica que reflete o ferro

armazenado; a saturação da transferrina que mede a absorção do ferro da dieta e seu transporte e, ainda, a dosagem de ferro sérico, dentre outras. Estes parâmetros adicionais constituem uma excelente ferramenta, muitas vezes indispensável, para se confirmar uma suspeita diagnóstica inicialmente levantada pelo hemograma, com base nos índices hematimétricos e morfologia observada na hematoscopia.

A punção da medula óssea pode fornecer informações sobre a produção de todas as células hematopoiéticas, reservas de ferro, celularidade medular, a presença de células tumorais e fibrose (ROSNER & GRUNWALD, 1997).

1.7 Anemias microcíticas e hipocrômicas

As anemias microcíticas e hipocrômicas são consideradas estados que acarretam diminuição da hemoglobina circulante e que cursam com prejuízo (dificuldade ou diminuição) da síntese de hemoglobina nas células precursoras eritróides (CPE) na medula óssea, gerando eritrócitos de pequeno tamanho e com baixa concentração de hemoglobina. Várias doenças produzem células sanguíneas vermelhas microcíticas e hipocrômicas tais como a anemia da deficiência do ferro, traço talassêmico, intoxicação pelo chumbo, inflamação crônica e anemia sideroblástica (ZAGO *et al.*, 2005).

No nosso meio, a deficiência de ferro (anemia ferropriva), deficiência de cadeias de globina (talassemias) e as doenças crônicas constituem as principais causas de anemias microcíticas e hipocrômicas (OLIVEIRA & NETO, 2004).

1.7.1 Anemia ferropriva

O ferro, juntamente com a eritropoetina, é necessário para a formação da hemoglobina (ZAGO *et al.*, 2005). Além disso, o ferro é um componente de proteínas necessárias em processos celulares cruciais tais como o transporte e utilização do oxigênio, produção de trifosfato de adenosina (ATP), síntese de ácido desoxirribonucléico (DNA), metabolismo de catecolaminas, transporte de elétrons mitocondrial e outros processos fisiológicos (BEARD *et al.*, 1996; NOBILI *et al.*, 2001; COHEN *et al.*, 2004). Dessa forma, o sistema imune, as funções neurológicas e o

desempenho no trabalho são todos afetados com a carência do ferro (NOBILI *et al.*, 2001).

O corpo humano tem aproximadamente 4000 mg de ferro sendo que 3000 mg circulam nas células sanguíneas vermelhas fazendo parte da molécula de hemoglobina; 800 a 1000 mg servem de reserva em um homem adulto e cerca de 300 mg na mulher (WORWOOD, 1997; ZAGO *et al.*, 2005). Seu armazenamento no organismo se faz tanto na forma de ferritina como de hemossiderina (ZAGO *et al.*, 2005). Pequenas quantidades de ferro também existem na mioglobina, transferrina e enzimas do citocromo. O corpo conserva o equilíbrio do ferro, uma vez que, em condições normais, apenas cerca de 1 mg/dia é perdida pela descamação de células epiteliais intestinais, micro sangramentos, suor e urina enquanto 1mg é absorvida diariamente da alimentação. Na mulher, a esta perda básica, soma-se a perda menstrual (cerca de 15 a 30 mg/ciclo), na gestação e parto (aproximadamente 1200mg) (TAPIERO *et al.*, 2001; HIGGINS & ROCKEY, 2003; ANDREWS, 2005; ZAGO *et al.*, 2005; ROCKEY, 2006). Aproximadamente toda a absorção do ferro da dieta ocorre no duodeno sob a forma iônica ou na forma heme. Várias etapas estão envolvidas na absorção do ferro iônico incluindo redução, captação, armazenamento intracelular no enterócito ou liberação para a corrente sanguínea na membrana basolateral. A redução do ferro férrico ao estado ferroso ocorre na borda em escova do enterócito pela ação da enzima DcytB, uma redutase férrica. O ferro no estado ferroso é, então, transportado através da membrana plasmática apical pelo transportador de metal divalente (DMT-1). A ocorrência de mutações no gene de DMT-1 resulta em inibição da absorção intestinal do ferro e grave anemia ferropriva (AF). O ferro absorvido pode ser armazenado intracelularmente como ferritina e, desta forma, ser excretado nas fezes juntamente com os enterócitos senescentes; ou, ser transferido ao plasma pela membrana basolateral através do transportador ferroportina 1, também conhecido como IREG1. Esta transferência é facilitada pela hefestina, um homólogo da ceruloplasmina com atividade de ferroxidase, que converte Fe^{+2} a Fe^{+3} (FLEMING *et al.*, 1997; FLEMING *et al.*, 1998; ANDERSON & FRAZER, 2005; FLEMING, 2005; GANZ, 2005). Com relação ao grupamento heme, este é separado da globina no lúmen intestinal e o ferro é transportado como porfirina intacta através da borda em escova (UC *et al.*, 2004). O

ferro ferroso é liberado no meio intracelular pela heme oxigenase fazendo parte do *pool* de ferro de baixo peso molecular do enterócito ou é transportado como porfirina intacta no plasma (QUIGLEY *et al.*, 2004). Inúmeros processos influenciam a absorção do ferro intestinal tais como as reservas de ferro corporais sendo, neste caso, inversamente relacionada; atividade eritropoética da medula óssea onde a absorção guarda uma relação diretamente proporcional à taxa de eritropoese; conteúdo de oxigênio sanguíneo; e, à presença de uma inflamação sistêmica. Tais processos permitem a manutenção de estoques adequados porém não excessivos e o conteúdo de ferro necessário à produção de células vermelhas (MIRET *et al.*, 2003; HENTZE *et al.*, 2004; ESCHBACH, 2005).

O homem adulto não tem aumento fisiológico da demanda de ferro. Assim, se ele não tiver qualquer absorção de ferro (muito raro), seus depósitos durariam pelo menos 3 a 4 anos (JOB, 1988).

O ferro incorporado na hemoglobina é utilizado repetidas vezes, através de um ciclo interno. Neste ciclo, dentro de poucos minutos após a ingestão de eritrócitos senescentes por macrófagos no baço e medula óssea, o ferro é extraído do grupamento heme pela ação da heme oxigenase; e, através da ferroportina retorna ao plasma onde se liga fortemente ao seu transportador extracelular, a transferrina. Após duas ou três horas, a transferrina se liga a receptores específicos localizados principalmente na superfície dos precursores das células vermelhas na medula óssea. O ciclo do ferro é completado quando os eritrócitos novamente formados são liberados para a circulação em sete a dez dias. Outra importante comunicação existe entre o ferro do compartimento plasmático e a mucosa intestinal e o fígado, embora esta via seja pequena se comparada com o maior ciclo do ferro dos eritrócitos (POSS & TONEGAWA, 1997; COOK, 2005; DELABY *et al.*, 2005; GANZ, 2005).

A anemia por deficiência de ferro é uma das doenças mais comuns no mundo afetando aproximadamente um bilhão de pessoas (NOBILI *et al.*, 2001; BRUGNARA, 2003). Esta anemia é a fase final de um processo que inicia pelo consumo das reservas de ferro e continua com a depleção do ferro dos demais compartimentos nos quais ele está contido, comprometendo a eritropoese normal (ZAGO *et al.*, 2005).

Na última década, ocorreram avanços que possibilitaram maior entendimento das conexões patológicas e fisiológicas entre o metabolismo do ferro e a eritropoese (ORKIN, 2000). O caráter molecular e as propriedades funcionais dos transportadores do ferro foram identificados (DONOVAN *et al.*, 2000). Além disso, o mecanismo responsável pelo aspecto microcítico e hipocrômico dos eritrócitos deficientes em ferro começou a ser desvendado. Fazendo parte de tal mecanismo se encontra o inibidor da síntese protéica heme-regulado (HRI), um membro de uma família de proteínas kinases que regula a iniciação da síntese protéica em células eucarióticas pela fosforilação da subunidade α do fator 2 de iniciação eucariótica (eIF2 α). A função primária de HRI é a coordenação da síntese de cadeias globínicas em reticulócitos com disponibilidade de heme sendo este necessário para a montagem das cadeias α e β globínicas dentro da hemoglobina. Assim, uma deficiência de heme induz a ativação de HRI, que subsequente fosforila a α -subunidade de eIF2, levando a inibição da síntese protéica. Isto previne o acúmulo de cadeias globínicas, cuja agregação é tóxica para os eritrócitos (HAN *et al.*, 2001; YUN *et al.*, 2005). Adicionalmente, foi visto que a supressão da síntese das cadeias α e β globínicas por HRI é responsável pela redução no conteúdo hemoglobínico dos eritrócitos deficientes em ferro (BRUGNARA, 2003). O mecanismo regulatório completo de HRI é parte de um grande e complexo sistema regulatório que promove a sobrevivência de células expostas a condições de estresse (RON, 2002).

As causas da deficiência de ferro são:

- 1) Aumento da demanda de ferro: período de crescimento rápido (crianças até dois anos e adolescentes), na gravidez e na amamentação.
- 2) Redução da ingestão: dietas carentes qualitativa ou quantitativamente (comuns em sociedades de baixa renda, vegetarianos estritos ou por dieta de emagrecimento mal orientada).
- 3) Redução da absorção, por acloridria, gastrectomia parcial ou total, síndrome do espru (reação alérgica a proteínas do trigo, que afeta a porção proximal do intestino delgado, onde o ferro é absorvido).

4) Perda crônica de sangue, por hemorragias crônicas do aparelho digestivo, verminoses (ancilostomíase e outras parasitoses), perdas menstruais excessivas e gravidezes múltiplas (LORENZI, 2003; COOK, 2005).

Contudo, a perda sanguínea é a mais importante causa isolada de deficiência do ferro. Quando o sangue é perdido externamente, um ciclo de balanço negativo do elemento se inicia e com isso a demanda excede a oferta levando a uma deficiência (GREENBURG, 1996). Segundo Rockey (1999), a deficiência do ferro pode ocorrer devido a uma inadequada absorção ou uma excessiva perda do elemento; sendo que a perda sanguínea gastrointestinal se constitui a causa mais comum de anemia ferropriva em homens e em mulheres no período pós menopausa.

A hemossiderose pulmonar e hemoglobinúria crônica da hemólise intravascular são raras causas da deficiência do ferro (COOK, 2005).

Os grupos mais atingidos na anemia ferropriva são os recém-nascidos prematuros, pois é conhecido que o feto recebe a maior parte do estoque de ferro no último trimestre da gravidez; os lactentes, cuja dieta é basicamente láctea, pobre em ferro e insuficiente para satisfazer as necessidades do crescimento rápido; crianças até 24 meses e adolescentes, que se encontram em período de crescimento rápido; e gestantes, cujo estoque férrico é compartilhado com o feto (LORENZI, 2003).

Os achados clínicos na deficiência de ferro podem ser sistematizados em:

- 1) Dependentes do nível de hemoglobina
- 2) Disfunção celular conseqüente à diminuição ou ausência de ferro não hemoglobínico, aquele que participa da atividade de certas enzimas, integrando ou não suas moléculas.

Os sintomas que dependem do nível de hemoglobina estão relacionados à hipóxia cerebral e incluem debilidade, astenia, dispnéia de esforço, formigamento, cefaléia, perversão do apetite ou desejo incontrolável de comer terra (pica) ou gelo (pagofagia) (LORENZI, 2003). Porém o sintoma clínico mais importante é a fadiga crônica (COOK, 2005). Além disso, ocorrem modificações epiteliais, com palidez da pele e mucosas, fissuração dos ângulos da boca, atrofia das papilas da língua e glossite, unhas frágeis, quebradiças, côncavas (coiloníquia), alterações do aparelho digestivo, disfunções esofagianas e gastrite (ROSNER & GRUNWALD, 1997; LORENZI, 2003).

As disfunções consequentes ao ferro não hemoglobínico incluem alterações na resposta imunológica, diminuição da atividade bactericida dos neutrófilos, alteração no metabolismo de hormônios tireoidianos, alteração na função do músculo liso e estriado, alteração no comportamento e diminuição dos linfócitos (OPPENHEIMER, 2001; LORENZI, 2003).

O diagnóstico laboratorial é baseado no hemograma, no estudo minucioso da série vermelha ao microscópio e em exames que avaliam a concentração de ferro no organismo (OLIVEIRA & NETO, 2004). A determinação da hemoglobina tem sido o método mais largamente usado para triagem da deficiência do ferro, mas quando é empregada como única medida laboratorial, apresenta sérias limitações para a identificação desta condição, devido a sua baixa especificidade e sensibilidade. A baixa sensibilidade ocorre porque um indivíduo com reservas normais de ferro deve perder uma grande quantidade do elemento antes que a hemoglobina diminua abaixo das várias definições laboratoriais de anemia. Este critério difere não apenas com a idade e sexo dos indivíduos, mas também entre laboratórios. A baixa especificidade da hemoglobina para a identificação da deficiência do ferro é devido aos numerosos casos de outras anemias vistas concomitantemente na clínica. Em virtude destes muitos distúrbios que mimetizam a deficiência do ferro, medidas laboratoriais adicionais à dosagem de hemoglobina são necessárias para a correta identificação desta anemia (COOK, 2005).

Na anemia ferropriva, a taxa de hemoglobina e o hematócrito estão diminuídos. O volume corpuscular médio e a concentração de hemoglobina corpuscular média são inferiores ao limite mínimo de referência. O volume do glóbulo vermelho é mais heterogêneo, então, o RDW apresenta valor superior ao normal. A contagem de reticulócitos é normal ou baixa, aumentando rapidamente após o início da terapêutica. A dosagem de ferro sérico é baixa, a transferrina saturada de ferro é baixa, a capacidade total de ligação do ferro (CTLF) é alta e a ferritina é baixa (JAMES & LAING, 1994; OLIVEIRA & NETO, 2004). Apesar de muito empregada, a dosagem de ferro sérico apresenta alguns inconvenientes pois a sua concentração exhibe variações diurnas, sendo geralmente maior pela manhã que à tarde, e podendo transitoriamente chegar a valores de referência depois de refeições ou suplementos férricos orais. A

flutuação circadiana é devido, em grande parte, à variação na liberação do ferro do sistema reticuloendotelial (SRE) para o plasma (WORWOOD, 1997; COOK *et al.*, 2003). Adicionalmente, mudanças no suprimento ou na demanda de ferro devido à infecção, inflamação ou injúria tecidual causam variações rápidas em seu valor sérico (WORWOOD, 1997). Além disso, as concentrações de ferro sérico exibem variação de acordo com a metodologia usada para a sua dosagem e também com a presença de hemólise (COOK *et al.*, 2003).

Eckfeldt & Witte (1994) sugeriram que a medida de ferro sérico deve ser combinada com a medida da capacidade de ligação total do ferro para ser útil na interpretação clínica. Já Wong *et al.* (1996) observaram que a percentagem ou índice de saturação de transferrina (IST) calculada a partir da medida do ferro e capacidade de ligação total é uma ferramenta útil no diagnóstico.

A ferritina, uma proteína de ligação ao ferro, é uma medida universalmente disponível e bem padronizada que oferece importantes vantagens sobre o exame da medula óssea para a detecção da deficiência do ferro (HARRISON & AROSIO, 1996; COOK, 2005). A dosagem de ferritina sérica é atualmente o teste laboratorial aceito para diagnosticar a deficiência do ferro, e níveis de ferritina inferiores a 12-20 µg/L, conforme metodologia usada, são indicadores altamente específicos de tal situação (MAST *et al.*, 1998). A ferritina sérica indica o nível da reserva de ferro do organismo (NOBILI *et al.*, 2001). Uma característica valiosa desta medida é que a sua concentração é diretamente proporcional às reservas de ferro do corpo em indivíduos saudáveis; 1µg/l de ferritina sérica corresponde de 8 a 10 mg ou 120 µg de ferro/kg de peso corpóreo (FINCH *et al.*, 1986). Porém, uma limitação bem conhecida da ferritina sérica é a elevação de seus valores independentemente do ferro em pacientes com inflamação aguda ou crônica, malignidade, doenças hepatocelulares, consumo de álcool, hipertireoidismo, uso de contraceptivos orais ou doença hepática (BRUGNARA, 2003; COOK, 2005). Assim, na presença de uma doença crônica, por exemplo, nenhum teste laboratorial do *status* do ferro por si só provê um diagnóstico exato da deficiência do ferro e um exame da medula óssea seria o mais indicado para estabelecer um diagnóstico definitivo (TELLINGEN *et al.*, 2001). A avaliação da concentração de ferro medular é o padrão-ouro no diagnóstico da deficiência do ferro e sua ausência

considerada o marcador definitivo desta condição (PUNNONEN *et al.*, 1997; HIGGINS & ROCKEY, 2003). É feita usualmente por métodos histoquímicos, e detecta a verdadeira deficiência do elemento distinguindo-a de outras doenças crônicas nas quais há um impedimento na liberação do ferro das células reticuloendoteliais (WORWOOD, 1997). Contudo esta técnica é invasiva, cara e demanda tempo (TELLINGEN *et al.*, 2001).

Punnonen *et al.* (1997) concluíram em seus estudos que a medida de ferritina pode oferecer uma base racional para a identificação da deficiência do ferro desde que haja uma cuidadosa classificação diagnóstica dos pacientes e o conhecimento de todos os fatores que podem causar alterações de seus níveis séricos.

Os valores séricos de ferritina são mais baixos em crianças que em adultos, e da puberdade à idade adulta suas concentrações são mais altas em homens que em mulheres. Em mulheres e homens idosos os valores são similares (WORWOOD, 1997).

Atualmente, atenção especial tem sido dada à zinco protoporfirina (ZPP). A zinco protoporfirina é um metabólito normal formado em pequenas quantidades durante a biossíntese do heme. A reação final do mecanismo de biossíntese do heme é a quelação do ferro com a protoporfirina. Porém, durante períodos de deficiência do ferro devido à privação na dieta, má absorção, excessiva perda sanguínea, aumento da demanda ou impedimento de sua utilização durante a eritropoese, o zinco se torna um metal substrato alternativo para a ferroquelatase levando a um aumento da formação da zinco protoporfirina. Esta substituição é uma das primeiras respostas bioquímicas à depleção do ferro, e acarreta o acúmulo da zinco protoporfirina nos eritrócitos circulantes. Assim, os níveis de zinco protoporfirina refletem o suprimento de ferro para a medula óssea (LABBÉ & RETTMER, 1989; LABBÉ *et al.*, 1999).

A utilidade da zinco protoporfirina não é limitada à detecção da anemia por deficiência de ferro. Na população normocítica, existem pacientes com ferritina baixa que, no entanto, possuem também nível elevado de zinco protoporfirina. Tais pacientes presumivelmente estão no estágio de depleção do ferro e próximos de serem ferro deficientes. Assim, a zinco protoporfirina é um teste sensível para detectar estes casos (WONG *et al.*, 1996). Hastka *et al.* (1994) sugeriram que a zinco protoporfirina pode ser usada em conjunto com outros testes para classificar o grau de deficiência do ferro.

Wong *et al.* (1996) recomendam que a zinco protoporfirina seja usada como uma ferramenta de *screening* para pacientes com hemácias microcíticas suspeitos de anemia ferropriva. Neste caso, se a ZPP estiver baixa, a AF pode ser descartada. Mas, se a ZPP estiver elevada, a AF pode ser confirmada com a ferritina ou IST.

As vantagens da dosagem laboratorial da ZPP incluem necessidade de pequeno volume de sangue, simplicidade da técnica, rapidez e reprodutibilidade. Contudo, para o laboratório clínico, os níveis de ZPP fornecem menos informação sobre reserva de ferro de pacientes anêmicos que a dosagem de ferritina sérica (WORWOOD, 1997).

A desvantagem da ZPP para o diagnóstico da deficiência do ferro reside no fato de que esta se encontra aumentada não apenas na deficiência do ferro, mas também em outras doenças que resultam em eritropoese insuficiente, tais como intoxicação pelo chumbo, anemia hemolítica e anemia de doença crônica (ADC) (HASTKA *et al.*, 1993; HARTHOORN-LASTHUIZEN *et al.*, 1998).

De forma semelhante à zinco protoporfirina, os níveis de protoporfirina eritrocitária livre, considerados uma medida do metabolismo intermediário, estão aumentados na deficiência do ferro, embora exista um grau de interferência entre minerais que usam as mesmas proteínas no metabolismo (JAMES & LAING, 1994).

Outro achado na anemia ferropriva é a ocorrência de hiperplasia das células eritroblásticas medulares e diminuição dos eritroblastos que contêm grãos de ferro. Os eritroblastos têm formas picnóticas e irregulares, sendo em geral microeritroblastos (OLIVEIRA & NETO, 2004).

Mais recentemente surgiu a medida do receptor sérico de transferrina (sTfR) como outro marcador bioquímico (BRUGNARA, 2003). O receptor de transferrina (TfR) é uma proteína transmembrana que possui duas cadeias polipeptídicas idênticas com 95 kD cada uma, ligadas por duas pontes dissulfeto. Este sistema interage com uma proteína denominada transferrina, responsável pelo transporte plasmático do ferro e que leva, a partir dessa interação, ferro às células. O complexo TfR-transferrina-ferro é internalizado via uma vesícula endocítica e, no compartimento intracelular, o ferro se dissocia do complexo TfR-transferrina. O ferro permanece no citosol, enquanto o complexo TfR-transferrina é reciclado de volta à superfície celular. Virtualmente todas as células, exceto células vermelhas maduras, têm TfR na sua superfície, mas os

maiores números estão no eritron, placenta e fígado. Em um adulto normal, em torno de 80% de TfR estão nos precursores eritróides da medula óssea (COOK *et al.*, 1993; BEGUIN, 2003).

Uma forma circulante de TfR foi encontrada em soro animal e humano. O receptor sérico de transferrina é um monômero solúvel truncado de receptor tissular, produzido por proteólise mediada por uma serina protease (BAYNES *et al.*, 1994) e que circula na forma de um complexo transferrina-receptor (SHIH *et al.*, 1990). A massa de sTfR medida no soro é proporcional à massa de TfR celular (R'ZIK *et al.*, 2001) e se origina principalmente de eritroblastos e em menor extensão de reticulócitos (R'ZIK & BEGUIN, 2001). A atividade eritropoética é o mais importante determinante dos níveis de sTfR, sendo que níveis diminuídos de sTfR são encontrados em situações caracterizadas por hipoplasia eritróide e níveis aumentados são vistos em situações de eritropoese estimulada como no caso da anemia megaloblástica, talassemias, anemia falciforme e anemias hemolíticas em geral (HUEBERS *et al.*, 1990; MAST *et al.*, 1998). Se a produção de células vermelhas está diminuída, como por exemplo, na ADC, anemia aplástica e na doença renal de estágio terminal, os valores de sTfR permanecem inalterados (SKIKNE *et al.*, 1990; FERGUSON *et al.*, 1992) diferentemente dos valores de ferritina (AHLUWALIA, 1998).

Além da eritropoese, o *status* do ferro também influencia os níveis de sTfR no soro. A privação de ferro resulta em rápida indução da síntese de TfR (COOK *et al.*, 1993; FEELDERS *et al.*, 1999). Quando comparados a indivíduos normais, os níveis de sTfR estão ligeiramente aumentados em pacientes não anêmicos, contudo deficientes em ferro; porém, estão dramaticamente aumentados em pacientes com anemia ferropriva (PUNNONEN *et al.*, 1997). Dessa forma, o receptor sérico de transferrina se correlaciona com a massa total de precursores eritróides e com a deficiência tecidual de ferro que aumenta o sTfR na proporção da gravidade da deficiência (SKIKNE *et al.*, 1990). Assim, a medida do receptor sérico de transferrina detecta a deficiência de ferro a nível celular (AHLUWALIA, 1998). Nos pacientes com anemia ferropriva, os níveis de sTfR exibem fortes correlações com vários índices eritrocitários indicativos de deficiência do ferro (KOTISAARI *et al.*, 2002) e estão inversamente relacionados com a ferritina sérica (OLIVARES *et al.*, 2000).

Punnonen *et al.* (1997) concluíram que medidas de TfR são úteis no diagnóstico da deficiência do ferro e na diferenciação dos vários tipos de anemia, porém, a combinação das medidas de ferritina e TfR é que fornece a mais alta especificidade e sensibilidade.

Devido à relação recíproca entre sTfR e medidas de ferritina, uma análise que usa a razão entre o receptor sérico de transferrina e a ferritina sérica tem mostrado excelente desempenho em estimar reservas de ferro corpóreas (SKIKNE *et al.*, 1990; PUNNONEN *et al.*, 1997). Além disso, alterações na razão receptor sérico de transferrina/ferritina também mostraram refletir a absorção do ferro e o verdadeiro aumento nas reservas corporais férricas após períodos de suplementação oral (COOK *et al.*, 2003).

Portanto, o *status* do ferro pode ser completamente avaliado usando a ferritina sérica como uma medida da reserva de ferro (depleção do ferro estocado), sTfR como uma medida da deficiência de ferro tecidual funcional (eritropoese deficiente em ferro) e a dosagem de hemoglobina como uma medida da deficiência do ferro avançada (anemia ferropriva) (SKIKNE *et al.*, 1990).

O diagnóstico correto da deficiência do ferro é importante por inúmeras razões. Primeiramente, por fornecer uma indicação precoce de uma doença gastrointestinal de base potencialmente séria (AHLUWALIA, 1998); e, também, porque a suplementação férrica sem a real existência de deficiência do elemento pode ser danosa ao paciente. O dano ao paciente se deve ao fato de o diagnóstico correto não ter sido feito e à própria sobrecarga de ferro que pode estimular a formação de radicais livres, sendo estes participantes da patogênese de várias doenças. Alguns trabalhos mostram uma correlação positiva entre reservas corporais do ferro e o risco de doença cardíaca coronariana (SALONEN *et al.*, 1994). Além disso, existem evidências de estudos epidemiológicos, ainda inconclusivos, que associam um alto conteúdo de ferro corporal a um risco aumentado de alguns tumores como o câncer de cólon ou hepático (HUANG, 2003). E, finalmente, uma terceira razão, seria devido aos efeitos colaterais gastrointestinais freqüentemente provocados pela terapia com ferro oral (PROVAN, 1999).

Uma vez que o diagnóstico de deficiência do ferro esteja estabelecido, os pacientes devem ser tratados com suplementos férricos por um longo período de tempo. Geralmente são necessários dois a três meses para que os níveis de hemoglobina retornem ao normal. Entretanto, na anemia ferropriva as reservas de ferro são depletadas e devem ser reconstituídas, processo este que requer aproximadamente quatro a seis meses. O ferro deve ser administrado preferencialmente com o estômago vazio ou entre as refeições para otimizar sua absorção. Se ocorrerem efeitos colaterais gastrointestinais, o suplemento férrico pode ser ingerido após as refeições apesar de diminuir sua absorção. Os sais ferrosos são melhor absorvidos que as formas férricas (JAMES & LAING, 1994; ROCKEY, 2006). A maior dificuldade na administração de ferro oral é a náusea e o desconforto epigástrico que ocorre dentro de uma ou duas horas após sua ingestão. Porém, deve-se sempre dar preferência ao ferro oral em relação ao parenteral como tratamento inicial. Richard Lee *et al.* (1999) sugerem que a terapêutica parenteral deve ser reservada aos pacientes que comprovadamente não respondem ao tratamento oral ou que exibem intolerância gastrointestinal para ferro, pois apesar de igualmente efetiva, é mais cara e tem efeitos colaterais mais arriscados. Para Cook (2005) existem três indicações para a terapia parenteral: perda de sangue que exceda a capacidade absorptiva do ferro sendo o trato gastrointestinal e útero os locais mais comuns desta perda; má absorção do ferro como na doença celíaca e na gastrite atrófica; e, a falta de tolerância aos efeitos colaterais gastrintestinais do ferro por parte dos pacientes. De maneira semelhante a estes pesquisadores, Handin *et al.* (2003) sugerem as seguintes indicações para o uso de ferro na forma parenteral: sangramento crônico cuja causa de base não puder ser completamente eliminada; má absorção gastrointestinal do ferro; doença inflamatória gastrointestinal; intolerância ao ferro oral e, ainda, baixos níveis de hemoglobina (inferiores a 6 g/dL) nos quais a transfusão é contra-indicada (objeção religiosa). O acompanhamento da terapia é essencial, e inclui a observação de uma leve reticulocitose após uma semana e a repetição da dosagem de hemoglobina após o primeiro mês de tratamento: um aumento de 1g/dl deveria ser esperado (JAMES & LAING, 1994; HIGGINS & ROCKEY, 2003).

Contudo, melhor que o tratamento é a prevenção. Existem três opções possíveis para a prevenção da anemia ferropriva, as quais são: educação sobre dieta; fortificação de alimentos com ferro e a própria suplementação com este. A educação sobre dietas obriga os pais e as crianças jovens a aprenderem como escolher uma dieta que contém quantidade adequada de ferro e que maximiza sua absorção. Na fortificação de alimentos o ferro é colocado em excesso em relação ao contido naturalmente na alimentação. E, finalmente, a suplementação com ferro poderia identificar crianças como sendo de alto risco para a deficiência do elemento; no entanto, há pouca experiência do seu papel na prevenção. Como dito anteriormente, a “overdose” de ferro é perigosa e a suplementação de rotina aumentaria o risco de sua ocorrência (JAMES & LAING, 1994). Tal complementação férrica é recomendada apenas no primeiro ano de vida e na gestação para prevenir a deficiência de ferro (JOB, 1988; MILMAN, 2006).

1.7.2 Talassemias

A hemoglobina é a molécula que carrega e transporta o oxigênio por todo corpo (HARTWELL *et al.*, 2005). A molécula normal é um tetrâmero formado por dois pares de cadeias globínicas ligadas a um grupo heme. O tipo de hemoglobina é determinado pela combinação das cadeias de globina (cadeias alfa, beta, gama e delta) (HILLIARD & BERKOW, 1996). As cadeias alfa são codificadas em duplicata por 2 genes estreitamente relacionados, alfa 1 e 2, no cromossomo 16. Já as cadeias não alfa (beta, gama e delta) são codificadas por um grupo de genes no cromossomo 11 (CLARKE & HIGGINS, 2000; HARTWELL *et al.*, 2005). Cada cadeia de globina é estruturalmente diferente e, assim, possui diferente afinidade pelo oxigênio, carga elétrica e mobilidade eletroforética. As hemoglobinas normais dos adultos são A, A₂ e F (fetal) e se encontram nas seguintes proporções: 96% da hemoglobina é A, que consiste de 2 cadeias alfa e 2 cadeias beta ($\alpha_2\beta_2$); 2,5 a 3,5% consiste de hemoglobina A₂ ($\alpha_2\delta_2$) e 1% ou menos de F ($\alpha_2\gamma_2$) (NAOUM, 1997; OLIVEIRA & NETO, 2004). Nos indivíduos normais a síntese de cadeias globínicas alfa e beta é finamente balanceada durante a diferenciação eritróide terminal provendo os glóbulos vermelhos de um conteúdo hemoglobínico e tamanho consistentes (HIGGS, 2004).

As anormalidades inerentes ao tetrâmero hemoglobina (Hemoglobinopatias) podem ser divididas em duas categorias: aquelas que são caracterizadas por anomalias estruturais das cadeias de hemoglobina, formando as chamadas hemoglobinas variantes; e outras que resultam de defeitos moleculares que reduzem ou cancelam completamente a síntese de uma ou mais das cadeias polipeptídicas da molécula de hemoglobina. A última definição refere-se às talassemias (WEATHERALL, 1997).

As talassemias são, então, anomalias hereditárias autossômicas recessivas comuns nos países da região do Mediterrâneo ao sudeste da Ásia e que são causadas por mais de 200 diferentes mutações do gen da globina. A maioria dos defeitos genéticos responsáveis pela talassemia são mutações pontuais, com troca ou perda de uma ou mais bases, que afetam os processos moleculares envolvidos na expressão do gen da globina. Uma minoria das mutações corresponde a deleções em gens (WEATHERALL, 2000; JOSHI *et al.*, 2004). Tais distúrbios genéticos são caracterizados pela diminuição parcial ou ausência total da produção de cadeias globínicas, sendo que teoricamente, existem tantos tipos de talassemia quantos são os tipos de cadeias globínicas. Porém, aquelas mais comumente encontradas e que apresentam relevância clínica são as formas alfa ou beta. Isso resulta em um desequilíbrio entre as cadeias alfa e beta e leva às características clínicas da talassemia (HILLIARD & BERKOW, 1996; SARNAIK, 2005). O defeito nos genes (quatro genes localizados no cromossoma 16) ligados a produção de cadeias α -globínicas resulta na α -talassemia e o defeito nos genes para cadeia β (dois genes localizados no cromossoma 11), nas β -talassemias (OLIVEIRA & NETO, 2004).

A anormalidade bioquímica primária nas talassemias é o defeito quantitativo na síntese e o acúmulo de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. A síntese reduzida de uma ou outra cadeia globínica da hemoglobina predominante no adulto, HbA ($\alpha_2\beta_2$), resulta em uma deficiência na hemoglobinização dos eritrócitos gerando uma anemia do tipo microcítica e hipocrômica. Paralelamente, a contínua síntese em quantidades normais das cadeias globínicas não afetadas resulta em acúmulo destas nos precursores eritróides. Por não encontrar cadeias globínicas complementares com as quais possam se ligar, este excesso de cadeias normais forma agregados instáveis que precipitam e oxidam a membrana dos eritrócitos. Estes precipitados levam a um

dano físico e oxidativo da membrana celular, resultando em destruição prematura das hemácias (HILLIARD & BERKOW, 1996; HANDIN *et al.*, 2003; OLIVEIRA & NETO, 2004).

A α -talassemia resulta da deficiência de um, dois, três ou quatro genes para síntese de cadeia α . A deficiência de quatro genes ($--/--$) é caracterizada pela ausência da produção de cadeias α e pela presença de HbH e Hb Bart's formadas pela precipitação dos tetrâmeros instáveis β_4 e γ_4 , respectivamente. Hb Bart's e HbH não fornecem oxigênio às células em tensões fisiológicas levando a uma grave hipóxia. Tal situação é incompatível com a vida e resulta no quadro de hidropsia com morte fetal no terceiro trimestre de gravidez ou logo após o nascimento devido à grave hipóxia, insuficiência cardíaca congestiva, ascite, edema e hepatoesplenomegalia. A deficiência de três genes (Doença da Hemoglobina H, $\alpha/-/$ ou $-\alpha/-$; $-/-\alpha$ ou $-/-\alpha$), cursa com anemia intensa e requer transfusões periódicas. A deleção de dois genes ($\alpha/-\alpha$ ou $- \alpha/-\alpha$; $- \alpha\alpha$ ou $\alpha\alpha/-$) da cadeia α globínica produz microcitose e hipocromia leves, com uma concentração de hemoglobina normal ou discretamente diminuída. A deficiência de um gen ($\alpha/-\alpha\alpha$ ou $-\alpha/\alpha\alpha$, $\alpha\alpha/-\alpha$ ou $\alpha\alpha/\alpha$) é, hematológica e clinicamente, assintomática (forma silenciosa) (HILLIARD & BERKOW, 1996; CLARKE & HIGGINS, 2000; JOSHI *et al.*, 2004; SARNAIK, 2005; MARENCO-ROWE, 2007) (Figura 1). Os tetrâmeros β_4 que se acumulam principalmente nas formas mais graves da α talassemia são mais estáveis e solúveis que os agregados de cadeia α da β talassemia e se precipitam mais lentamente. Portanto, não se observa na α talassemia as marcantes eritropoese ineficaz e destruição intramedular dos precursores eritróides que é característica principalmente da β talassemia homozigota. A precipitação da HbH formando corpos de inclusão ocorre de forma mais gradual e se faz preferencialmente em eritrócitos maduros do que nas células precursoras eritróides nucleadas. O baço remove estes corpos de inclusão causando lesões nos eritrócitos, o que resulta em sua destruição prematura (HILLIARD & BERKOW, 1996; HANDIN *et al.*, 2003; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). Em virtude da participação das cadeias α na formação de hemoglobinas do período embrionário, fetal e pós nascimento, a produção defeituosa

da globina α afeta ambos feto e adulto (NAOUM, 1997; HIGGS, 2004; MARENGO-ROWE, 2007).

As β -talassemias se referem a um grupo de distúrbios genéticos da hemoglobina em que há uma síntese reduzida (β^+ talassemia) ou até ausência (β^0 talassemia) na produção de cadeias β . Isso leva a um desequilíbrio entre a síntese de globina α e não α sendo este o maior fator para a gravidade da doença. Na β talassemia, a síntese normal de α globina pelos gens α não afetados resulta no acúmulo, dentro das células eritróides, de cadeias α livres. As cadeias α livres não são capazes de formar tetrâmeros viáveis e precipitam-se formando corpos de inclusão nos precursores eritróides. Quando esta precipitação ocorre na medula óssea observam-se fenômenos como peroxidação dos lipídeos da membrana eritrocitária e geração de radicais livres, espécies ativadas do oxigênio. Além disso, o excesso de cadeias α acumuladas e seus produtos de degradação interagem com a membrana, causando anormalidades na espectrina e banda 4.1. Desta forma, os eritrócitos de pacientes portadores de β talassemia exibem uma deformabilidade celular marcadamente reduzida com aumento da rigidez e diminuição da estabilidade mecânica da membrana. Ainda em nível de células eritroblásticas, a precipitação de globinas α causa o bloqueio da síntese de DNA com conseqüente interrupção da síntese de globinas. O somatório dos mecanismos citados: precipitação de globina α , rigidez celular e lesão do DNA, provoca a eritropoese ineficaz responsável pela anemia e aumento da absorção do ferro observada nesta doença. Os eritrócitos com corpos de inclusão compostos por globinas α , ao atingirem o sangue periférico, são sequestrados nos sinusóides esplênicos durante a circulação em virtude de sua rigidez associada às lesões da membrana. O resultado dessa atuação fisiopatológica é uma anemia hemolítica de graus variáveis com aumento da concentração de bilirrubina indireta e esplenomegalia (NAOUM, 1997; WEATHERALL, 1998; WEATHERALL, 2000; HANDIN *et al.*, 2003; SARNAIK, 2005; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). Baseado no número de deleções, as β talassemias incluem três grandes categorias clínicas: a β -talassemia maior (ausência dos 2 genes), associada a manifestações clínicas graves e quase sempre potencialmente fatal, a β -talassemia menor (ausência de um gene) com manifestações clínicas leves ou mínimas, e formas

intermediárias entre a maior e a menor, a β -talassemia intermediária (comprometimento parcial da expressão dos genes) (Figura 1). Além disso, ocorre no nosso meio, com relativa frequência, a combinação do gene talassêmico com o gene para outra hemoglobina variante, por exemplo S/ β -talassemia (RAVEL,1997). No momento do nascimento, a síntese de HbF ainda constitui cerca de 60 a 80% do total, e a substituição pela HbA está quase completa entre o terceiro e o sexto mês de vida. Devido a isto, as anormalidades da globina β , constituintes da HbA, não se manifestam ao nascimento (ALTER, 1979; SARNAIK, 2005).

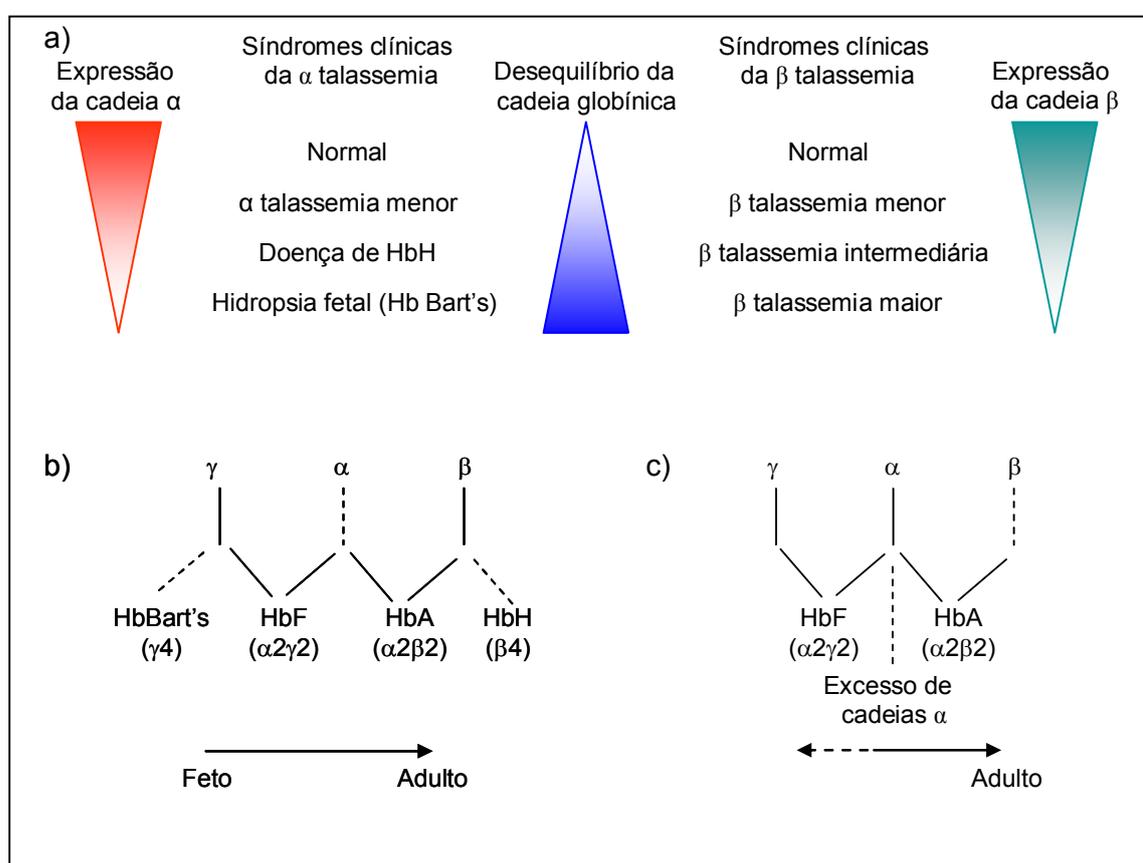


Figura 1 - Um resumo das síndromes clínicas chaves (a) e a fisiopatologia da α (b) e β (c) talassemia. As consequências da síntese reduzida de α e β globina são indicadas por linhas pontilhadas. Observar que a α talassemia afeta ambos feto e adulto enquanto a β talassemia se torna aparente apenas após o nascimento. HbF pode persistir ou se tornar reativada durante a hematopoese do adulto na β talassemia (extraído e adaptado de HIGGS, 2004).

Na β -talassemia maior e nas formas intermediárias graves há anemia hemolítica importante, hepato e esplenomegalia que ocorrem devido à destruição dos eritrócitos anormais principalmente no baço e, ainda, retardo no desenvolvimento psíquico. A anemia produzida pela síntese não balanceada de cadeias globínicas estimula a produção de eritropoetina, levando a uma intensa proliferação e expansão da medula óssea e, conseqüentemente, a deformidades ósseas. Nestas formas de talassemia há necessidade de transfusões de sangue freqüentes. Na β -talassemia menor e nas formas intermediárias leves, há uma anemia discreta e persistente, que piora em situações de sobrecarga do organismo, como na gravidez, ocorrência de doenças crônicas, verminoses, etc. De modo geral, não há necessidade de transfusão de sangue (NAOUM, 1997; WEATHERALL, 2000).

A talassemia é o mais comum distúrbio monogênico do mundo (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998). Carreadores de β talassemia estão espalhados pelo mundo inteiro com um alto índice entre descendentes de ancestrais do Mediterrâneo e em alguns países em desenvolvimento (NOBILI *et al.*, 2001). Nas áreas onde a talassemia é prevalente, a freqüência de carreadores de α talassemia varia de 1% (no sul da Espanha) a 90% (populações tribais da Índia). Similarmente, a freqüência de carreadores da β talassemia pode variar de 1% (norte da Itália) a 50-70% (em algumas regiões do sudeste da Ásia). Variações consideráveis ocorrem mesmo dentro de um único país. Foi estimado que no mundo existem 270 milhões de carreadores de alelos mutantes da globina que podem potencialmente causar formas graves de talassemia e hemoglobinopatia (incluindo a anemia falciforme), e todo ano nascem em torno de 300 a 400 mil crianças gravemente afetadas (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998). Também tem sido observado nos últimos 50 anos, que com a melhoria da economia mundial e a diminuição global dos índices de mortalidade infantil, a talassemia está rapidamente emergindo como um grande problema de saúde e econômico em países em desenvolvimento, uma vez que as crianças com talassemia que de outra maneira teriam morrido de infecção e má nutrição agora sobrevivem e requerem tratamento por toda a vida. Portanto, no mundo todo, a talassemia é um enorme problema hematológico que se encontra em ascensão em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WEATHERALL & CLEGG, 2001).

A eletroforese de hemoglobina é amplamente usada para a classificação das talassemias (PAN *et al.*, 2005), tendo como princípio o movimento das diversas hemoglobinas ou cadeias hemoglobínicas, contendo diferentes cargas, no campo elétrico. Em pH alcalino, a hemoglobina é carregada negativamente e se moverá para o pólo positivo (anodo). No caso da α talassemia, tal exame mostra diminuição variável das hemoglobinas normais (A, A_2 e F), de acordo com o comprometimento da capacidade de síntese de cadeia α . Uma banda de migração rápida, correspondente ao tetrâmero de cadeias β (Hb H) é visível nos casos mais graves. Na deficiência de quatro genes (Hidropsia fetal) é mantida a síntese de hemoglobina embrionária (Portland) e aparece uma banda de migração rápida correspondente às cadeias γ (Hb Bart's). A hemoglobina Bart's (tetrâmeros γ_4) é encontrada nas primeiras semanas de vida enquanto a hemoglobina H (tetrâmeros β_4) pode ser observada em pacientes adultos (SARNAIK, 2005). Outro método diagnóstico para as α talassemias é a pesquisa de HbH. HbH é uma hemoglobina instável que se precipita nos eritrócitos podendo ser visualizada após coloração vital como pequenos pontos azulados dispostos homogeneamente. Contudo, esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade para o traço α -talassêmico devendo ser utilizada apenas como um teste confirmatório e não como um método de *screening* da α talassemia (HARTWELL *et al.*, 2005). A observação de corpos de inclusão de HbH requer prática do analista e tempo disponível, além do fato de que formas diferentes da α talassemia podem mostrar padrões de precipitação também diferentes; a ausência desses corpos não exclui a α talassemia (NAOUM, 1997). Assim, as formas heterozigóticas da α talassemia em adultos podem ser sugeridas pela presença de uma leve microcitose e hipocromia e níveis normais de HbA₂ e HbF associadas à ausência de deficiência do ferro. Entretanto, o diagnóstico preciso requer a demonstração de deleções nas cadeias alfa detectáveis por métodos de biologia molecular; ou, ainda, por meio de estudos da síntese de cadeias globínicas mostrando uma diminuição na razão entre cadeias alfa e cadeias beta (HILLIARD & BERKOW, 1996; ELDIBANY *et al.*, 1999). Estes métodos apresentam grande acurácia mas são bastante onerosos dificultando sua aplicação de rotina (ELDIBANY *et al.*, 1999). Em relação a β talassemia, a eletroforese de

hemoglobina mostra ausência ou diminuição da HbA e aumento variável de HbA₂ e HbF, conforme a deficiência para a síntese de cadeias β (HILLIARD & BERKOW, 1996; NAOUM, 1997; LORENZI, 2003). Na β talassemia menor, objeto de estudo do presente trabalho, um aumento de HbA₂ é o parâmetro indicador da presença de tal hemoglobinopatia, embora existam outras causas, contudo incomuns, onde HbA₂ estaria aumentada. Seriam elas: algumas hemoglobinas instáveis, hipertireoidismo e anemia megaloblástica (SARNAIK, 2005; TRENT, 2006).

A microscopia nas talassemias revela hemácias de formas e tamanhos muito variados (anisopoiquilocitose), presença de hemácias em alvo, de esquisócitos, ponteados basófilos e corpúsculos de Howell-Jolly e de eritroblastos. A contagem de reticulócitos é elevada e proporcional ao grau de hemólise (HILLIARD & BERKOW, 1996; LORENZI, 2003). A dosagem de sTfR encontra-se elevada devido ao fato já citado anteriormente de serem as talassemias classificadas como anemias hemolíticas e, conseqüentemente, cursarem com eritropoese aumentada. Em um recente estudo de Demir *et al.* (2004) observou-se que os níveis de sTfR de pacientes com β talassemia menor foram menores quando comparados a indivíduos portadores de anemia ferropriva, porém, maiores quando comparados a indivíduos normais, sugerindo haver um grau de eritropoese ineficaz na β talassemia menor que proporcionou um aumento da atividade eritropoética.

As dosagens de ferro, bilirrubinas, haptoglobinas, urobilinogênio fecal e urinário mostram alterações características de anemia hemolítica. Há aumento da saturação da transferrina e do RDW que se encontra elevado nas formas mais graves da talassemia devido à significativa anisocitose. Entretanto o RDW tem valor normal, no caso da β talassemia menor (ZAGO *et al.*, 2005).

A zinco protoporfirina pode estar aumentada nas anemias hemolíticas incluídas as talassemias (HARTHOORN-LASTHUIZEN *et al.*, 1998) o que se mostra em concordância com os resultados de Tillyer & Tillyer (1994) que observaram aumento da ZPP na α e β talassemia menor.

O tratamento dos pacientes portadores de talassemia mais gravemente afetados, ou seja, aqueles com maiores graus de anemia, envolve transfusões freqüentes de eritrócitos absolutamente necessárias para manter a vida do paciente. O suporte

transfusional adequado permite o crescimento e desenvolvimento normais e previne a insuficiência cardíaca congestiva, deformidades ósseas mais graves e endocrinopatias. Usualmente, as transfusões ocorrem a cada três semanas, mantendo um nível de hemoglobina entre 9 e 12g/dL. Contudo, cada unidade transfundida (200 mL) contém 200 a 250 mg de ferro e o organismo não tem mecanismos fisiológicos para a remoção das reservas de ferro. Desta forma, o acúmulo de ferro com tendência à hemossiderose ocorre de maneira inevitável e resulta em uma disfunção multisistêmica envolvendo principalmente órgãos com mais altos níveis de receptor de transferrina, a saber: o coração, fígado e sistema endócrino. O ferro acumulado nos tecidos causa dano celular presumivelmente por acelerar a formação de espécies reativas derivadas do oxigênio que oxidam proteínas e lipídeos das células. Particularmente, o coração é o órgão alvo letal na talassemia. As complicações, incluindo-se a insuficiência cardíaca devido à sobrecarga de ferro, são responsáveis por 71% dos óbitos de pacientes portadores de talassemia maior. No sistema endócrino, o ferro se deposita no hipotálamo, hipófise, tireóide e gônadas levando a quadros de hipotireoidismo, hipogonadismo com atraso na puberdade e baixa estatura. Devido a esta sobrecarga de ferro em vários órgãos os pacientes regularmente transfundidos necessitam fazer uso de quelantes que apesar de úteis na remoção do excesso de ferro não são destituídos de complicações. Um dos quelantes disponíveis é a deferoxamina, comercialmente conhecido como Desferal, que atua removendo o ferro ligado e não ligado à transferrina no sangue e na bile. A deferoxamina deve ser administrada por infusão intravenosa ou subcutânea. Os altos custos do medicamento além de seus efeitos colaterais limitam sua utilidade e aceitabilidade. Outro quelante seria o deferiprone administrado por via oral que, ao contrário da deferoxamina, pode penetrar nas células e se ligar ao ferro intracelular. Um terceiro quelante, o deferasirox, é relativamente não tóxico e remove o ferro do fígado. Os quelantes podem produzir efeitos tóxicos diretos e, também, alterações na homeostase do ferro (absorção, distribuição e utilização) interferindo com enzimas dependentes de ferro (lipooxigenase, redutase ribonucleotídica) ou provocar a remoção de outros metais, como o zinco e o cálcio, dos *pools* metabólicos essenciais (GIARDINI, 1997; MOHAMMADIAN *et al.*, 2003; COHEN *et al.*, 2004; JOSHI *et al.*, 2004; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005; COHEN, 2006). Além da terapia quelante para os pacientes

talassêmicos dependentes de transfusão, esta modalidade de tratamento pode ser necessária também em pacientes portadores de talassemia intermediária e maior onde se verifica um aumento da absorção do ferro devido à eritropoese ineficaz (RUND & RACHMILEWITZ, 2000; NOBILI *et al.*, 2001; SARNAIK, 2005).

A necessidade de transfusões se estende por toda a vida do indivíduo a menos que se proceda a um tratamento curativo como o transplante alogênico de medula óssea. Contudo, apenas 30% dos pacientes apresentam um doador de células tronco na família com um tipo de antígeno leucocitário humano (HLA) compatível, sendo esta pequena proporção de doadores um fator limitante para o transplante. Além disso, o procedimento está associado a uma mortalidade total em torno de 20%; sendo o sucesso do transplante dependente, em grande parte, das condições clínicas do paciente anteriores ao transplante (LUCARELLI *et al.*, 2002; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005).

Outra alternativa de tratamento para as α e β talassemias graves é a esplenectomia. Nas variantes talassêmicas importantes o baço se encontra freqüentemente aumentado de volume devido a uma destruição anormal de eritrócitos, ao fenômeno de eritropoese extramedular ou também à hiperplasia do sistema monocítico-macrofágico. As indicações para a esplenectomia são a esplenomegalia dolorosa, pancitopenia e hemólise de hemácias transfundidas devido ao hiperesplenismo. Após o procedimento é observada uma significativa melhora dos parâmetros hematimétricos em geral (GIARDINI, 1997; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005).

Além destas formas de tratamento, são usados também os compostos antioxidantes, pois existem suposições de que radicais livres estejam envolvidos na fisiopatologia da talassemia. A liberação de pequenas quantidades de ferro livre das cadeias α não pareadas nos eritrócitos de pacientes β talassêmicos pode iniciar por si só reações de redox que, simultaneamente, depletam o potencial redutor celular, oxidam hemoglobina e aceleram a destruição de hemácias (SCOTT & EATON, 1995). Inúmeras substâncias originárias de plantas, incluindo a rutina, um flavonóide, (GRINBERG *et al.*, 1994) e polifenóis têm propriedades antioxidantes. Tais compostos

previnem a oxidação da hemoglobina e o dano à membrana dos eritrócitos (GRINBERG *et al.*, 1997).

No caso específico das formas graves de β talassemias, o uso de compostos que aumentam a síntese e a produção da cadeia globínica γ é de particular importância uma vez que estas cadeias gama formadas se combinariam com o excesso de cadeias alfa desemparelhadas, compensando a diminuição de cadeias beta. A combinação das cadeias γ com as cadeias α produz a HbF, uma hemoglobina útil no transporte de oxigênio; e, de forma ainda mais importante, observa-se a redução do fenômeno explosivo das cadeias α que é responsável por grande parte da fisiopatologia das β talassemias. É bem conhecido que mesmo pequenos aumentos na produção de HbF promovem melhora do quadro clínico (HILLIARD & BERKOW, 1996; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). Um destes compostos, a hidroxiuréia, que atua como inibidora da redutase ribonucleotídica, aumenta o nível de HbF e pode melhorar o curso clínico de pacientes com S/ β talassemia, talassemia maior, intermediária e anemia falciforme homocigota, embora seu preciso modo de ação não seja claro. Contudo, a hidroxiuréia possui efeitos colaterais importantes, entre eles, a mielossupressão (ATWEH & LOUKOPOULOS, 2001; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). Outros indutores da síntese de HbF seriam os inibidores da deacetilase de histonas incluindo ácidos graxos de cadeia curta tais como o butirato. Os derivados do butirato apresentam como reação adversa o desconforto abdominal. Além da hidroxiuréia e dos derivados do butirato, podem ser citados ainda como indutores da síntese de HbF, os agentes inibidores da metil transferase que atuam provocando uma hipometilação do DNA, mecanismo este que se sobrepõe à supressão da síntese de cadeias gama. Porém, de maneira semelhante à hidroxiuréia estes compostos podem produzir mielossupressão. Torna-se necessário, então, avaliar a relação custo-benefício do tratamento com os indutores da síntese de HbF (DOVER, 1998; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). A eritropoetina em doses farmacológicas promove um aumento na síntese de cadeias globínicas gama podendo também ser utilizada como indutora da síntese da HbF (RUND & RACHMILEWITZ, 2000; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005).

A terapia genética com a inserção nas células tronco hematopoéticas de um número apropriado de cópias de genes de cadeias globínicas α e β têm se tornado uma

nova esperança para a cura das α e β talassemias. Entretanto, tal método ainda não se tornou uma opção clínica viável de tratamento (SCHRIER & ANGELUCCI, 2005).

1.7.3 Anemias por doenças crônicas

A anemia da doença crônica foi estabelecida como uma entidade distinta em 1952, após estudos da anemia associada a infecção (CARTWRIGHT & WINTROBE, 1952). Todos os estudiosos concordaram com as três grandes causas clínicas: infecção, inflamação e neoplasia, que são responsáveis por 75% dos casos deste tipo de anemia (FITZSIMONS & BROCK, 2001). Hoje, a anemia da doença crônica é a anemia mais freqüente entre pacientes hospitalizados, particularmente quando se analisam pacientes com idade superior a 65 anos, e a segunda causa mais freqüente de anemia, após a anemia ferropriva. Esta síndrome clínica se desenvolve comumente nos casos de doenças inflamatórias e infecciosas crônicas, câncer, ou doenças autoimunes (CANÇADO & CHIATTONE, 2002; WEISS, 2002; ROY *et al.*, 2003; MEANS, 2004), confirmando os estudos anteriormente realizados. Apesar da doença crônica que leva a anemia ser facilmente identificada, tal identificação não acontece em todos os casos devendo-se suspeitar de uma doença oculta na ocorrência de anemia inexplicada. A anemia da doença crônica pode, ainda, coexistir com outros tipos de anemia (FITZSIMONS & BROCK, 2001).

Atualmente, considera-se a ADC, em parte, como um defeito no metabolismo do ferro (MEANS & KRANTZ, 1992). Diferentes mecanismos contribuem para a ADC, tais como o desvio cinético do ferro da circulação para o armazenamento no sistema reticuloendotelial, diminuição da eritropoese, baixa produção de eritropoetina em relação ao grau de anemia, associada a uma menor resposta dos precursores eritróides medulares a ela, eritrofagocitose e invasão da medula óssea por patógenos e células tumorais (Figura 2). Todavia, a ADC é o reflexo de um sistema imune ativado e resulta, possivelmente, de uma estratégia de defesa inovadora do corpo na tentativa de retirar o ferro, um fator de crescimento essencial para patógenos invasores e, com isso, aumentar a eficácia da imunidade mediada por célula (WEISS, 2002). Desta forma, a indução da hipoferremia e o desvio do metabolismo do ferro que ocorrem sob condições inflamatórias também possuem efeitos potencialmente positivos.

Primeiramente porque a retirada do ferro da circulação e sua estocagem dentro do sistema reticuloendotelial diminuem a disponibilidade desse nutriente essencial para microrganismos e células tumorais que necessitam do metal para crescimento e multiplicação; limitando, portanto, a proliferação de patógenos (WEINBERG, 1999). Segundo, porque o desenvolvimento de anemia limita a capacidade de transporte do oxigênio em geral, e os tecidos que proliferam rapidamente são os mais afetados, uma vez que o oxigênio é essencial para o metabolismo energético e, assim, para a proliferação e diferenciação das células. E, finalmente, porque a redução das quantidades circulantes de ferro metabolicamente ativo fortalece a resposta imune direcionada contra patógenos invasores e células tumorais por estimular os mecanismos imunes efetores mediados por célula de macrófagos e por afetar a diferenciação de linfócitos (WEISS, 2005).

A fisiopatologia da ADC engloba, então, os seguintes mecanismos:

1) Distúrbios na homeostase do ferro

Em macrófagos presentes em regiões inflamatórias ocorrem várias mudanças metabólicas, não apenas em relação ao metabolismo do ferro. Após ativação, células T, células NK e macrófagos produzem um número de citocinas que, diretamente ou via a formação secundária de proteínas de fase aguda ou radicais, modulam, a nível transcricional e pós-transcricional, a expressão de gens críticos para o metabolismo do ferro. Tais mecanismos de modulação afetam a captação celular do ferro, o transporte transmembrana, a recirculação, o armazenamento, bem como a absorção do elemento (MEANS, 2003).

Desta forma, a ferritina, uma proteína que consiste de subunidades H e L, é regulada a nível de DNA por citocinas e pode agir como um elemento de fase aguda positivo, que aumenta em resposta a um processo infeccioso ou inflamatório de base (KLAUSNER *et al.*, 1993). Assim, TNF- α e IL-1 promovem hiperferritinemia através da indução transcricional do gen da ferritina em macrófagos e hepatócitos. Já a citocina pró-inflamatória IL-6 e também IL-1 modulam a tradução da ferritina via a estimulação de um *box* de fase aguda localizado dentro da região não transcrita do mRNA da

ferritina (TORTI & TORTI, 2002). Finalmente, IL-4, IL-10 e IL-13 estimulam a tradução da ferritina por um mecanismo dependente dos elementos responsivos ao ferro (IREs) e proteínas regulatórias do ferro (IRPs) (WEISS, 2002). Em mamíferos, o controle da homeostase intracelular do ferro é realizado, em grande parte, pela ligação pós-transcricional de IRPs, que são proteínas citoplasmáticas regulatórias do ferro, aos chamados elementos responsivos ao ferro, presentes em regiões não traduzidas dos mRNAs de algumas proteínas tais como ferritina e receptor de transferrina (THEIL, 2000). Então, quando a célula necessita de ferro, IRPs se ligam a IREs do mRNA do TfR prolongando seu tempo de meia-vida e, conseqüentemente, aumentando a expressão da proteína TfR; enquanto diminui a tradução do mRNA da ferritina, e, com isso, há um aumento da captação e da disponibilidade do ferro dentro da célula. De forma inversa, níveis elevados de ferro diminuem a atividade ligante das IRPs a IREs, levando a uma tradução eficiente do mRNA da ferritina e a uma diminuição da estabilidade do mRNA de TfR (KONIJN *et al.*, 1999). A redução da expressão de TfR por algumas citocinas leva ao questionamento de como as células estimuladas por tais mediadores adquirem ferro para a incorporação na ferritina e armazenamento no sistema reticuloendotelial. Uma provável explicação é que estas citocinas podem estimular a expressão e/ou a capacidade de transporte do transportador de metal divalente. DMT-1 é uma proteína transmembrana, primeiramente caracterizada no duodeno, que realiza o transporte do ferro no estado ferroso do lúmen intestinal para dentro do enterócito e da transferrina plasmática para os precursores eritróides. Uma das regiões não traduzidas 3' contém um elemento regulatório do ferro semelhante ao encontrado no mRNA do receptor de transferrina, sugerindo que a expressão protéica de DMT-1 pode ser controlada pós transcricionalmente pela concentração intracelular de ferro. Desta forma, este IRE se ligaria a IRPs sob baixas concentrações de ferro, estabilizando o mRNA do DMT-1 e levando a um aumento da produção deste transportador (BYRD & HORWITZ, 1993; GUNSHIN *et al.*, 1997; ANDREWS, 1999; LUDWICZEK *et al.*, 2003). Além deste aumento na captação do ferro por diferentes mecanismos que não via TfR, pode haver também a inibição da reciclagem do ferro por bloqueio de sua exportação levando à retenção do elemento dentro de macrófagos (WEISS, 2005).

Outras proteínas de fase aguda tais como a hepcidina e a α_1 -antitripsina (α_1 -AT) também agem pós-transcricionalmente e afetam diretamente os mecanismos de importação e exportação do ferro das células (ANDREWS, 2004).

Portanto, a ação combinada dessas citocinas e seus subprodutos leva tipicamente a um desvio do metabolismo do ferro, resultando em um armazenamento do ferro dentro das células do sistema reticuloendotelial, enquanto os níveis circulantes do elemento são reduzidos e sua disponibilidade para as células progenitoras eritróides é restringida. Assim, sob condições de ativação imune crônica, ocorrem hipoferremia e hiperferritinemia que são a marca característica da anemia da doença crônica (WEISS, 2002). Tal condição de hipoferremia leva a uma eritropoese com restrição de ferro e, finalmente, a uma anemia de intensidade leve a moderada (FLEMING, 2005; GANZ, 2005).

2) Inibição da proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides

As citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IFN- γ e interferons tipo 1 e tipo 2, induzem anemia pelo bloqueio da proliferação e diferenciação das células progenitoras eritróides (BFU-e e CFU-e) (MEANS, 2003). Tais citocinas podem interagir com a formação ou função de fatores de crescimento para a eritropoese, como o eritropoetina; e, induzir apoptose ou a inibição do crescimento das células tronco. Porém, parte destes efeitos inibitórios do TNF- α e do INF- γ sobre a eritropoese se devem a indução da formação de óxido nítrico (NO) ou de radicais tóxicos de oxigênio. O NO bloqueia a eritropoese, devido, em parte, ao seu efeito inibitório na biossíntese do heme (MACIEJEWSKI *et al.*, 1995; WEISS, 2005). A ação supressora dessas citocinas sobre a eritropoese supera a ação estimuladora da EPO resultando na diminuição da resposta da medula óssea à EPO e à eritropoese (CANÇADO & CHIATTONE, 2002). Atualmente, existem evidências de que a hepcidina também produz um efeito inibitório sobre a sobrevivência e proliferação dos progenitores eritróides através de sua ação pró-apoptótica (DALLALIO *et al.*, 2006).

Além disso, o desvio do ferro e sua subsequente disponibilidade limitada às células progenitoras eritróides também é um importante fator que contribui para a

inibição da proliferação de tais células por impedir a biossíntese do heme (WEISS, 2005).

3) Alteração do ciclo de vida do eritrócito

Durante processos inflamatórios, a eritrofagocitose por células monocíticas circulantes e residentes está aumentada, e isto pode ser atribuído à ação de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, durante processos inflamatórios as membranas dos eritrócitos sofrem danos por radicais derivados de células imunes estimuladas por citocinas tais como o TNF- α , tornando os eritrócitos mais susceptíveis a eritrofagocitose. Isto é compatível com a observação de que durante os estados inflamatórios ocorre um aumento do ferro derivado de eritrócitos em macrófagos esplênicos e células de Kupffer (MOLDAWER *et al.*, 1989; MOURA *et al.*, 1998). Outra explicação para a diminuição do ciclo de vida do eritrócito seria a tentativa do organismo de aumentar a quantidade de ferro disponível para a eritropoese aumentando, assim, a atividade fagocítica de macrófagos do sistema reticuloendotelial (ROY *et al.*, 2003).

4) Diminuição da resposta à eritropoetina

Os níveis de eritropoetina em pacientes com ADC estão aumentados quando comparados com indivíduos saudáveis, porém, tais níveis estão baixos para o grau de anemia. Além disso, a resposta das células formadoras de colônia à EPO depende da gravidade da doença e se encontra deficiente na ADC, devido, provavelmente à ação inibitória de citocinas inflamatórias e da presença de uma quantidade de ferro insuficiente para proliferação celular e biossíntese do heme (MEANS & KRANTZ, 1991; RODRIGUEZ *et al.*, 2001).

5) Infiltração da medula óssea

A supressão da eritropoese pode ser exercida também por células tumorais invasoras, microrganismos e seus produtos tóxicos, tal como é visto na infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV); que induzem, por si só, a formação de citocinas pró-inflamatórias que inibem a eritropoese (BOELAERT *et al.*, 1996).

A intrigante relação entre imunidade e homeostase do ferro ganhou nova dimensão após a identificação da proteína de fase aguda hepcidina, um derivado hepático, cujo propeptídeo consta de 84 aminoácidos sendo subsequente clivado para gerar a sua forma ativa de 25 aminoácidos (GANZ, 2003). A hepcidina é uma proteína antibacteriana de fase aguda com expressão aumentada em resposta a uma infecção ou estímulo inflamatório, participando na defesa do hospedeiro; e que pode ser encontrada no sangue ou na urina (NEMETH *et al.*, 2003; MEANS, 2004). A primeira evidência do envolvimento da hepcidina na homeostase do ferro foi proveniente da observação de que a expressão do mRNA da hepcidina hepática estava aumentada em comundongos com sobrecarga de ferro da dieta. A expressão da hepcidina é, então, aumentada pela sobrecarga de ferro e diminuída na anemia ou na deficiência do elemento (PIGEON *et al.*, 2001). O aumento da expressão da hepcidina de forma congênita ou transgênica resulta em grave anemia por deficiência de ferro (NICOLAS *et al.*, 2002; WEINSTEIN *et al.*, 2002). A expressão da hepcidina é também regulada por todos os fatores reguladores da absorção intestinal do ferro a saber: reservas do ferro, atividade eritropoética, hemoglobina, conteúdo de oxigênio sanguíneo e inflamação. Em cada uma destas situações, a absorção intestinal férrica varia inversamente com a expressão hepática da hepcidina sendo este peptídeo considerado como um regulador negativo da absorção entérica do ferro (NICOLAS *et al.*, 2001; NICOLAS *et al.*, 2002). Foi observado que animais sujeitos à hipóxia ou anemia hemolítica apresentavam concentrações diminuídas de mRNA de hepcidina hepática enquanto aqueles com sobrecarga de ferro da dieta ou inflamação sistêmica têm aumento da expressão deste peptídeo (PIGEON *et al.*, 2001; NICOLAS *et al.*, 2002). Os mecanismos pelos quais a hepcidina pode induzir hipoferremia incluem uma inibição da absorção do ferro no

duodeno e um bloqueio da liberação do elemento pelos macrófagos através da interação com a ferroportina e/ou hepcidina, embora estes mecanismos funcionais não tenham sido conclusivamente caracterizados (FLEMING & SLY, 2001; NEMETH *et al.*, 2004) (Figura 2). A ferroportina é um transportador transmembrana basolateral de ferro que permite o efluxo do elemento de hepatócitos, macrófagos e enterócitos. É conhecido que a hepcidina se liga a ferroportina, que funciona como seu receptor na superfície de tais células, induzindo a internalização do complexo receptor-ligante e sua degradação pelo lisossomo. A degradação lisossomal da ferroportina induzida pela hepcidina resulta em um aprisionamento do ferro nestas células e conseqüente diminuição do ferro sérico disponível (NEMETH *et al.*, 2004; GANZ, 2005; KNUTSON *et al.*, 2005). Entretanto, o aprisionamento do ferro nas células do sistema reticuloendotelial que acompanha os estados inflamatórios não é causado apenas pela internalização e degradação da ferroportina. Estudos feitos por Weinstein *et al.* (2002) indicam que a inflamação também diminui a expressão da ferroportina nas células reticuloendoteliais do baço, fígado e medula óssea. Além disso, o aumento da concentração de ferro intracelular do enterócito leva a uma diminuição secundária da expressão dos genes envolvidos na captação apical duodenal do ferro tais como DMT-1 e DcytB; e, conseqüentemente, contribuindo para a redução da absorção férrica no intestino (FLEMING, 2005). Atualmente, estudos como o de Nemeth *et al.* (2004) indicam que a IL-6 tem particular importância na indução da expressão da hepcidina durante a inflamação atuando diretamente nos hepatócitos. De forma contrária à IL-6, TNF- α , uma outra citocina inflamatória, inibe a produção da hepcidina (ANDREWS, 2004). Apesar de extensivamente investigada, ainda não existem evidências conclusivas mostrando que pacientes portadores de ADC apresentam níveis elevados de hepcidina (HUGMAN, 2006).

Além da hepcidina, a proteína de fase aguda α_1 antitripsina (α_1 AT) interfere com a homeostase do ferro por bloquear competitivamente a ligação da transferrina ao TfR, reduzindo, assim, a captação de ferro mediada por TfR. As células progenitoras eritróides são altamente dependentes deste mecanismo para a captação do ferro. Desta forma, a exposição das células eritróides a α_1 AT resulta em contenção do crescimento e apoptose, contudo α_1 AT não exerce tais efeitos sobre células

monocíticas uma vez que tais células possuem outros caminhos para adquirir ferro. Então, α_1 AT pode contribuir para distúrbios da homeostase do ferro sob condições inflamatórias por bloqueio da utilização do elemento por células progenitoras eritróides enquanto aumenta a disponibilidade de ferro para as células do sistema reticuloendotelial (GRAZIADEI *et al.*, 1994).

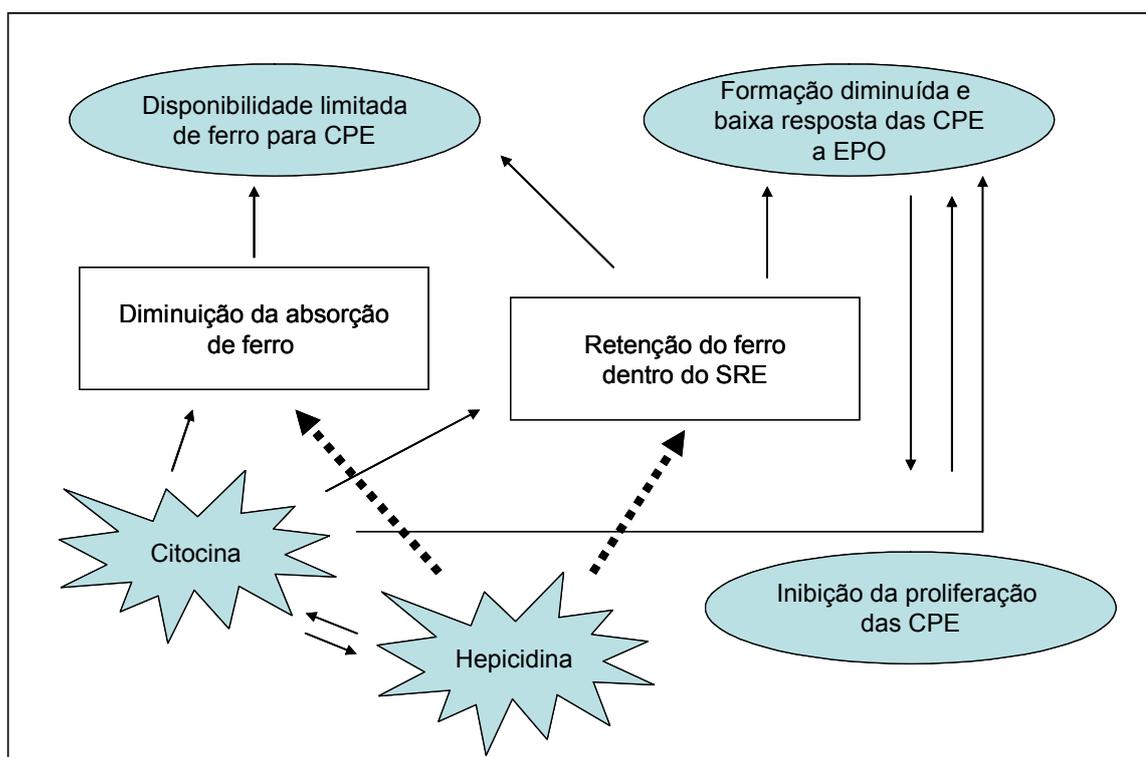


Figura 2 - Fatores fisiopatológicos para o desenvolvimento da ADC. CPE - células precursoras eritróides, EPO - eritropoetina, SRE - sistema reticuloendotelial (extraído e adaptado de WEISS, 2005).

O diagnóstico da ADC é frequentemente considerado um diagnóstico de exclusão. Contudo, existem características que juntamente com um perfil clínico compatível, podem estabelecer o diagnóstico. Na avaliação laboratorial constata-se, geralmente, uma leve a moderada anemia normocítica-normocrômica (WEISS, 2005) podendo nos casos de evolução lenta e diminuição do conteúdo de ferro corporal total, tornar-se microcítica/hipocrômica (ROY *et al.*, 2003). O RDW geralmente é normal ou apenas levemente aumentado, a diminuição da hemoglobina não chega a níveis tão baixos quanto os da ferropriva, a contagem de reticulócitos é baixa (OLIVEIRA & NETO, 2004). Em relação aos parâmetros férricos podemos encontrar baixos ou normais o ferro sérico, a saturação de transferrina e as concentrações de transferrina (WEISS, 2005). Os valores de capacidade de ligação total do ferro encontram-se usualmente diminuídos (WONG *et al.*, 1996). Porém, com relação ao ferro sérico, sua diminuição é mais comum, pois a indução de hipoferremia é uma marca característica no desenvolvimento da anemia de doença crônica, também conhecida como anemia da inflamação (WEISS, 2005). Por outro lado, os níveis séricos de ferritina estão normais ou aumentados (WONG *et al.*, 1996; WEISS, 2002; ROY *et al.*, 2003). Níveis de citocinas e zinco protoporfirina IX também podem estar aumentados (WEISS, 2002).

Outras alterações bioquímicas que podem estar presentes no paciente com ADC incluem: aumento de fibrinogênio, ceruloplasmina e da proteína C reativa, diminuição da haptoglobina e albumina, aumento da velocidade de hemossedimentação e aumento do cobre sérico (KUSHNER, 1982; MORLEY & KUSHNER, 1982).

Ao contrário do que ocorre na anemia ferropriva, os níveis de sTfR não estão aumentados na anemia das doenças crônicas, o que tem sido considerado como um bom indicador na distinção entre as duas patologias (FERGUSON *et al.*, 1992; JAYARANEE & STHANESHWAR, 2006). A produção diminuída de eritropoetina e a supressão da eritropoese por citocinas podem ser as razões responsáveis pela ausência de elevação de sTfR na anemia da inflamação (BEGUIN, 2003).

Por outro lado, pacientes com anemia de doenças crônicas podem ter concomitantemente uma verdadeira deficiência de ferro e, assim, apresentarem níveis de sTfR similarmente elevados como na anemia ferropriva pura (PETTERSSON *et al.*, 1996). Se os valores de sTfR diminuem após suplementação de ferro adequada, isto

mostra que existe simultaneamente anemia ferropriva e que sTfR são bons indicadores de deficiência funcional de ferro (SUOMINEN *et al.*, 2000). Porém, em alguns estudos, os níveis de sTfR não poderiam distinguir entre algumas doenças inflamatórias com ou sem deficiência de ferro concomitante (JUNCA *et al.*, 1998). Contudo, o uso combinado de sTfR e ferritina ou dos índices TfR/ferritina ou TfR/log ferritina pode aumentar a eficácia de sTfR em identificar a deficiência de ferro em pacientes com inflamação crônica (REMACHA *et al.*, 1998). No estudo de Genc *et al.* (2004) foi observado que ambos sTfR e o índice transferrina/ferritina foram maiores em pacientes com anemia ferropriva se comparados aos pacientes com ADC. Para Worwood (1997), nos casos de suspeita de concomitância de ADC e anemia ferropriva, o achado de valores de ferritina menores que 15 µg/L indicam a ausência de estoques de ferro e valores maiores que 100 µg/L indicam presença de reserva férrica na medula óssea. Valores situados entre 15 e 100 µg/L constituem uma chamada “área cinza” de difícil interpretação, onde o autor recomenda combinar a dosagem de ferritina a outro teste como a velocidade de sedimentação eritrocitária (VHS) ou proteína C reativa (PCR); um valor inferior a 30 mg/L para a PCR é considerado um limite razoável para eliminar a influência de um processo inflamatório na dosagem da ferritina sérica (COOK, 2005). Já o estudo desenvolvido por Kis & Carnes (1998) sugere que um valor de ferritina sérica igual ou inferior a 100 ng/mL tem uma alta especificidade para diagnosticar a presença de deficiência do ferro em pacientes apresentando doenças agudas ou crônicas. Cançado & Chiattonne (2002) indicam um valor de ferritina sérica inferior a 12 ng/mL como confirmatório de deficiência de ferro, enquanto valores acima de 200 ng/mL praticamente excluem esse diagnóstico, mesmo em pacientes com doença inflamatória ou neoplásica. O diagnóstico de um estado de deficiência do ferro em concomitância com a anemia de doença crônica se torna importante visto que a existência de anemia ferropriva necessita tratamento com ferro oral ou parenteral (GENC *et al.*, 2004).

Paradoxalmente à hipoferremia, a análise do ferro medular em pacientes com ADC revela a presença de reservas normais ou aumentadas de ferro devido, particularmente, ao distúrbio de mobilização e/ou reutilização do elemento pelos precursores eritróides (CANÇADO & CHIATTONE, 2002). Desta forma, a anemia de doença crônica que não apresenta concomitância com a anemia ferropriva pode ser

distinguida da última pela presença de estoques de ferro coráveis nos macrófagos do sistema reticuloendotelial da medula óssea (FLEMING, 2005).

O tratamento da anemia da doença crônica significa, geralmente, tratar o distúrbio de base, após o que as concentrações de hemoglobina aumentariam (FITZSIMONS & BROCK, 2001). Além disso, são usadas as transfusões para a rápida correção dos níveis de hemoglobina quando necessárias, e a eritropoetina recombinante humana para uma terapia prolongada (WEISS, 2002). A administração da EPO é uma alternativa para reduzir a necessidade de transfusões sanguíneas e evitar as complicações relacionadas ao procedimento, tais como transmissão de agentes infecciosos e reações hemolíticas e não hemolíticas (WIEL, 2004).

Contudo, os índices de resposta à eritropoetina recombinante são, algumas vezes, baixos (WEISS, 2002).

Futuramente, o desenvolvimento de antagonistas farmacológicos da hepcidina pode vir a ser uma alternativa benéfica no tratamento da anemia de doença crônica quando a doença de base for refratária à terapia. A função destes antagonistas seria uma potencial reversão da eritropoese com restrição de ferro, o que contribuiria para reduzir o quadro de anemia (GANZ, 2005; HUGMAN, 2006).

1.7.4 Índices para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor

A microcitose é uma manifestação comumente presente em algumas anemias e constitui importante indicativo para limitar o diagnóstico clínico a quatro condições bem definidas a saber: deficiência do ferro, talassemia menor, anemia de doença crônica e anemia sideroblástica. Em nosso meio, as anemias microcíticas e hipocrômicas mais comuns são: a anemia ferropriva, anemia de doença crônica e talassemia menor. Quando o diagnóstico é baseado somente nos parâmetros do hemograma e na morfologia dos eritrócitos, a talassemia menor, usualmente uma anemia microcítica de grau leve a moderado pode ser diagnosticada erroneamente como anemia ferropriva. Porém, é clinicamente importante diferenciar entre estas duas anemias uma vez que apresentam patogênese, tratamento e prognóstico inteiramente diferentes. A anemia ferropriva é facilmente corrigida pela suplementação com ferro enquanto o mesmo tratamento na talassemia menor deveria ser usualmente evitado (LAFFERTY *et al.*,

1996; ELDIBANY *et al.*, 1999; YERMIAHU *et al.*, 1999). Além disso, o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas se torna, muitas vezes, complexo em virtude de concomitância de doenças, além de demandar tempo e apresentar uma investigação laboratorial com custos significativos (TILLYER & TILLYER, 1994; MELO *et al.*, 2002).

Com a finalidade de racionalizar a abordagem diagnóstica tem sido proposto o uso de índices derivados de parâmetros comumente disponíveis em modernos contadores automáticos. Estes índices poderiam, assim, proporcionar uma análise mais rápida e menos onerosa fornecedora de valiosos indícios da presença de anemia ferropriva ou talassemia menor (MELO *et al.*, 2002; ALFADHLI *et al.*, 2006).

Vários índices desenvolvidos com esta finalidade podem ser citados e seis deles foram testados no presente estudo para a verificação de sua eficiência na distinção entre anemia ferropriva e β talassemia menor, a saber: Índice de Mentzer (IM), Índice de Srivastava (S), Shine e Lal (SL), Índice derivado do RDW (IRDW), Índice de Green & King (IGK) e um novo índice desenvolvido neste trabalho, denominado Novo Índice (NI) (MENTZER, 1973; SRIVASTAVA & BEVINGTON, 1973; SHINE & LAL, 1977; GREEN & KING, 1989; JAYABOSE *et al.*, 1999). As fórmulas e os valores de *cut-off* dos referidos índices são mostrados na Tabela 1.

O Índice de Green & King foi criado em 1988 e por ocasião de seu estabelecimento, identificou corretamente 100% dos pacientes com anemia ferropriva e 100% dos pacientes portadores de β talassemia menor na amostra estudada por Green & King (GREEN & KING, 1989). Este índice foi usado para comparação com o Novo Índice desenvolvido neste trabalho (NI).

Tabela 1 - Fórmulas e valores de *cut-off* para seis índices de discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor.

Índice	Fórmula	Valor de <i>cut-off</i>
IGK	$[(VCM)^2 \times RDW]/(Hb \times 100)$	AF > 65 Tal < 65
NI	$1,91 \times Hm + 0,44 \times CHCM$	AF < 23,85 Tal > 23,85
S	HCM/Hm	AF > 4,4 Tal < 4,4
IRDW	$VCM \times RDW / Hm$	AF > 220 Tal < 220
SL	$(VCM)^2 \times HCM$	AF > 1530 Tal < 1530
IM	VCM/Hm	AF > 13 Tal < 13

AF - anemia ferropriva, Tal - talassemia menor, IGK - Índice de Green & King, NI - Novo Índice, S - Índice de Srivastava, IRDW - Índice do RDW, SL - Índice Shine & Lal, IM - Índice de Mentzer, VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, Hm - número de hemácias, Hb - hemoglobina, RDW - índice de anisocitose eritrocitária.

1.7.5 Plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e índice de anisocitose plaquetária (PDW) nas anemias microcíticas e hipocrômicas

A megacariocitopoese, um complexo processo de desenvolvimento celular que leva à produção de plaquetas, é dependente de fatores de crescimento hematopoéticos que agem em suas fases inicial e tardia. Os estágios iniciais proliferativos do processo são sustentados por fatores estimulantes de colônia megacariocítica. Os estágios posteriores são dependentes de citocinas megacariocitopoéticas adicionais. Uma vez formadas, as células progenitoras comprometidas com a linhagem megacariocítica passam por uma maturação final em resposta a uma citocina linhagem-específica, a trombopoetina (TPO) (KAUSHANSKY, 1995).

A trombocitose, ou produção aumentada de plaquetas, é observada em muitos distúrbios e estados patológicos. Uma contagem elevada de plaquetas pode ser causada por um mecanismo reacional ou pode ser resultante de aumento da produção autônoma (neoplásica). Uma grande variedade de condições clínicas e cirúrgicas pode resultar em um fenômeno de trombocitose reativa. Estas incluem infecções, doenças inflamatórias, malignidades, cirurgias, hemólise ou sangramento agudo, recuperação de uma trombocitopenia, anemia ferropriva, após esplenectomia e na artrite reumatóide. Porém, as causas mais comuns são infecção, estado pós cirúrgico, malignidade, esplenectomia, perda aguda de sangue e anemia ferropriva (GILES, 1981; DAN, 2005).

A trombocitose reativa na anemia ferropriva é usualmente de grau leve a moderado e os mecanismos que a causam não são conhecidos (DAN, 2005). Contudo, vários estudos tentaram elucidar os mecanismos deste fenômeno sobre o aspecto das citocinas trombopoéticas. Entre estes estudos podem ser citados o de Akan *et al.* (2000), cujos pesquisadores avaliaram os níveis séricos de trombopoetina, eritropoetina, fator inibitório da leucemia, IL-6 e IL-11; entretanto, nenhuma destas citocinas mostrou influência na trombocitose reativa da anemia ferropriva. Em estudos feitos em animais, altas doses de eritropoetina recombinante humana produzem um aumento na contagem plaquetária, sendo que este mesmo efeito tem sido observado em pacientes portadores de insuficiência renal em terapia com eritropoetina recombinante humana (LOO & BEGUIN, 1999). Ambas, eritropoetina e trombopoetina, são membros da mesma subfamília de fatores de crescimento hematopoéticos. O

segmento amino terminal da trombopoetina mostra uma seqüência bastante similar à eritropoetina (DAN, 2005). Para Bilic & Bilic (2003) esta seqüência homóloga entre eritropoetina e trombopoetina poderia explicar o sinergismo fisiológico observado entre TPO e EPO na produção de plaquetas. Neste caso, quando os níveis de EPO se encontram elevados, como na anemia ferropriva, a seqüência de aminoácidos similar à TPO pode causar trombocitose. Tais pesquisadores se basearam no fato de que a normalização da contagem plaquetária em crianças com anemia ferropriva e trombocitose, usualmente ocorre após a correção da anemia, devido ao retorno da EPO aos níveis normais. Algumas vezes, contudo, a expansão da eritropoese parece exercer um efeito negativo na produção de plaquetas (PERLMAN *et al.*, 2002). A trombocitopenia secundária pode estar relacionada à competição entre o desenvolvimento da linhagem megacariocítica e a eritrocítica (LOO & BEGUIN, 1999).

Contudo, existem evidências contrárias à hipótese de Bilic & Bilic (2003). Para Racke (2003) há uma relação inconsistente entre níveis elevados de EPO e contagem elevada de plaquetas. Primeiramente, devido à existência de alguns pacientes portadores de anemia ferropriva e níveis elevados de EPO apresentando contagem de plaquetas normal. Além disso, outras condições associadas com elevados níveis de EPO, tais como anemias hemolíticas citando-se entre estas as talassemias, não estão associadas à trombocitose. Finalmente, Broudy *et al.* (1997) sugerem não haver competição entre TPO e EPO pela ligação aos seus receptores, Mpl e o receptor de EPO, respectivamente. Desta forma, Racke (2003) sugere uma atuação da EPO a nível de um progenitor bipotente (apresentando capacidade de dar origem à linhagem megacariocítica ou eritrocítica) que pode se comprometer com a linhagem megacariocítica e, posteriormente, ter o crescimento estimulado pela TPO. Porém estes mesmos autores reconhecem que esta hipótese é falha para explicar a ausência de uma resposta uniforme entre indivíduos apresentando níveis elevados de EPO, o que leva à suposição de que mecanismos desconhecidos contribuem para a atividade trombopoética relacionada à anemia ferropriva.

Inúmeras outras citocinas incluindo IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-11 e fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF) também devem ser considerados no desenvolvimento megacariocítico (KAUSHANSKY, 1995; KAUSHANSKY, 1998). A

trombocitose reativa é frequentemente observada nas doenças de caráter inflamatório. Embora uma relação causa-efeito permaneça não confirmada, as citocinas inflamatórias podem ter um papel no aumento da produção plaquetária de tais condições (AKAN *et al.*, 2000). Dan *et al.* (1995), ao analisarem a trombocitose reativa associada aos estados inflamatórios em ratos, sugeriram fortemente que níveis aumentados de IL-1 e TNF estimulam indiretamente a megacariocitopoese via outras citocinas tais como IL-6 que se mostrou extremamente elevada após a administração de ambos, IL-1 e TNF. É conhecido que a trombocitose é comumente associada a vários processos infecciosos e inflamatórios agudos e crônicos. Então, estas citocinas poderiam ter importante participação na trombocitose devido à inflamação. Os estudos de Teramura *et al.* (1992) investigando o efeito da IL-11 recombinante humana na megacariocitopoese sugerem a atuação direta desta citocina como fator potenciador do processo. Podem ser citados ainda os trabalhos de Carrington *et al.* (1991) e de Hill *et al.* (1991). Ambos relatam que a IL-6 e, em menor extensão, a IL-3 têm um potente efeito trombopoético. IL-6 causa marcante elevação da ploidia, da produção e contagem plaquetária e do tamanho de megacariócitos. Na artrite reumatóide, um tipo de doença crônica, a trombocitose é uma complicação comum e tende a se correlacionar com a gravidade do processo. Embora o mecanismo exato responsável pela trombocitose permaneça desconhecido, é possível que citocinas pró-inflamatórias estimulantes da megacariocitopoese estejam envolvidas (KACENA & HOROWITZ, 2006).

Outro parâmetro plaquetário de importância é o volume plaquetário médio. Existem evidências que o VPM é determinado durante a fragmentação dos megacariócitos em plaquetas (THOMPSON *et al.*, 1983). No trabalho de Giles (1981) foi observada uma relação inversa entre VPM e contagem de plaquetas quando esta variou entre 50 a $900 \times 10^9/L$. O volume plaquetário também está correlacionado com a função plaquetária e pode ser um índice mais sensível que o número de plaquetas como um marcador de vários distúrbios de interesse clínico. Valores aumentados no volume plaquetário foram encontrados na pré-eclâmpsia, estando este aumento correlacionado com a gravidade da doença (MARTIN *et al.*, 1983; AHMED *et al.*, 1993). No infarto do miocárdio, plaquetas maiores mostraram ser um fator de risco independente (MARTIN *et al.*, 1991). Também na doença inflamatória intestinal,

algumas vezes complicada por eventos tromboembólicos, as plaquetas têm um papel crucial. Nesta doença foi observada uma diminuição do VPM associada principalmente à atividade da mesma (KAPSORITAKIS *et al.*, 2001). Kapsoritakis *et al.* (2001) sugerem a existência de uma relação entre alterações no VPM observadas na doença inflamatória intestinal e o próprio processo inflamatório. Alterações no VPM podem, ainda, estar associadas à insuficiência renal crônica quando os pacientes estão sendo tratados com eritropoetina recombinante humana. No estudo de Sharpe *et al.* (1994) foi verificado um significativo aumento do VPM nos pacientes com IRC em terapia com eritropoetina recombinante humana. Assim, estes pesquisadores sugeriram que a eritropoetina recombinante humana afeta a trombopoese e pode ser parte de um grupo de fatores humorais contribuindo para o desenvolvimento e maturação megacariocítica. As plaquetas maiores são mais reativas e podem contribuir para o risco aumentado de trombose associado à terapia com eritropoetina recombinante humana. Neste mesmo trabalho, não foram observadas alterações significativas na contagem de plaquetas e no índice de anisocitose plaquetária. Baseando-se neste resultado, os pesquisadores sugeriram que a contagem de plaquetas é independente do tamanho das mesmas e que a eritropoetina recombinante humana atua nos megariócitos produzindo plaquetas maiores.

É conhecido, ainda, que a produção e destruição aumentadas de plaquetas causam elevações do VPM (TROWBRIDGE & MARTIN, 1987). Outros fatores que podem elevar o VPM são a hipercolesterolemia, o diabetes melitus e a reposição com estrógeno (INUI *et al.*, 1994; BATH & BUTTERWORTH, 1996; RANGANATH *et al.*, 1996).

Finalmente, o terceiro índice plaquetário PDW pode ter seus valores aumentados secundariamente a uma elevação do VPM (TIMURAGAOGLU *et al.*, 2004). Aumento do PDW pode ocorrer devido a uma elevação dos níveis de EPO que levariam, possivelmente, a uma produção acelerada de plaquetas (DESSYPRIS *et al.*, 1987).

A investigação de possíveis alterações nos parâmetros número de plaquetas, VPM e PDW nas anemias microcíticas e hipocrômicas torna-se, assim, de grande importância uma vez que tais parâmetros podem contribuir de forma adicional na diferenciação entre as referidas anemias.

1.7.6 Alterações morfológicas das hemácias no filme sanguíneo nas anemias microcíticas e hipocrômicas

Como parte de uma completa avaliação hematológica de rotina, a minuciosa análise do filme sanguíneo pode ser útil por fornecer indícios quanto à presença de uma determinada doença. Alterações morfológicas tais como pontilhados basófilos e hemácias em alvo não estão definitivamente associadas com uma hemoglobinopatia, entretanto, são achados úteis se, no caso da talassemia, o VCM ou HCM estiverem abaixo dos valores de referência (TRENT, 2006). Desta forma, é possível a observação no filme sanguíneo de pacientes talassêmicos, de eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, anisopoiquilocitose de graus leve a acentuado conforme a forma de talassemia encontrada, com presença de hemácias em alvo, dacriócitos, pontilhados basófilos, corpos de Howell Jolly, esferócitos e ovalócitos. Nas formas mais graves da doença observam-se numerosos eritroblastos e alterações morfológicas exuberantes. A policromatofilia refletindo reticulocitose conseqüente à hiperatividade da medula óssea, pode ser notada também em graus variáveis conforme a gravidade da talassemia (NAOUM, 1997; HANDIN *et al.*, 2003; CAVALIERE, 2004; ZAGO *et al.*, 2005).

O filme sanguíneo de pacientes portadores de anemia ferropriva apresenta hemácias microcíticas e hipocrômicas, anisocitose variável conforme gravidade da doença, discreta poiquilocitose podendo ser visualizados dacriócitos, ovalócitos e hemácias em alvo. A policromatofilia geralmente não está presente; e, quando observada, é de grau leve uma vez que a contagem de reticulócitos na anemia ferropriva é normal ou diminuída (HANDIN *et al.*, 2003; ZAGO *et al.*, 2005).

A anemia de doença crônica, inicialmente normocítica e normocrômica, se torna à medida de sua progressão, microcítica e hipocrômica. A distensão sanguínea de pacientes portadores de anemia de doença crônica não apresenta formas eritrocíticas anormais esclarecedoras ou patognomônicas, embora ovalócitos possam ser encontrados. A formação de *rouleaux*, constituído por hemácias empilhadas, ocorre em processos inflamatórios devido ao aumento das imunoglobulinas e do fibrinogênio sendo também frequentemente uma alteração associada à hiperproteinemia do mieloma múltiplo. Na anemia da insuficiência renal crônica (IRC), um tipo de ADC, pode haver a formação de equinócitos e acantócitos. A policromatofilia geralmente não é

observada na ADC devido à contagem de reticulócitos se mostrar dentro dos valores de referência ou diminuída (ROSNER & GRUNWALD, 1997; HANDIN *et al.*, 2003; ZAGO *et al.*, 2005).

2 JUSTIFICATIVA

Embora muito se conheça a respeito da fisiopatologia dos estados que levam a anemias microcíticas e hipocrômicas, bem como o emprego de métodos laboratoriais para a detecção das mesmas, ainda existe muito a se descobrir.

Apesar da anemia não ser considerada uma condição clínica grave pela maioria dos médicos, esta é mais comum do que se imagina (GOODNOUGH & NISSENSON, 2004). As anemias se tornam, assim, um grande problema de saúde pública. Como exemplos, a anemia ferropriva cuja prevalência em diferentes regiões do mundo varia de 12 a 43% e a anemia de doença crônica, muito freqüente entre pacientes hospitalizados (BREYMANN, 2002; WEISS, 2002). A deficiência de ferro é a mais comum das alterações nutricionais na infância, não apenas nas nações em desenvolvimento mas também em países altamente industrializados (COUTINHO *et al.*, 2005). Os números são assustadores: 2 bilhões de pessoas (em torno de 30% da população mundial) são anêmicos, principalmente devido à deficiência do ferro, situação frequentemente exacerbada pela malária e doenças parasitárias em países em desenvolvimento (WHO, 2007). Além disso, a deficiência do ferro possui importante impacto funcional em humanos por trazer também conseqüências econômicas tais como menor habilidade cognitiva nas crianças e diminuição da capacidade de trabalho em adultos (HORTON & ROSS, 2003).

Da mesma forma, as talassemias constituem os distúrbios genéticos mais comuns e simples no mundo inteiro, causando também um grande problema de saúde pública. A melhor estimativa disponível indica que 250 milhões, correspondentes a 4,5% da população mundial, são heterozigotos para um defeito no gen da globina (TUZMEN & SCHECHTER, 2001). Torna-se, assim, de grande importância um estudo de caracterização de tais anemias, na tentativa de se otimizar o diagnóstico diferencial entre estas utilizando-se, se possível, apenas um hemograma. A possibilidade de simplificação do diagnóstico se reveste de particular importância considerando que grande parcela da população não dispõe de recursos para exames mais detalhados, ou ainda, que não tenham sido solicitados pela clínica médica. A expectativa de que um estudo minucioso firmado sobre os parâmetros do rotineiro hemograma pudesse propiciar um melhor entendimento na distinção entre os diversos tipos de anemias microcíticas e hipocrômicas, tanto em laboratórios clínicos como na prática médica,

interferindo positivamente no diagnóstico e tratamento dos pacientes, motivou profundamente o desenvolvimento deste trabalho. Dessa forma, poder-se-iam evitar gastos adicionais e o tratamento seria direcionado a cada uma das anemias.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar as anemias microcíticas e hipocrômicas quanto ao metabolismo do ferro e perfil hemoglobínico em pacientes com idade superior a 18 anos, com VCM inferior a 80 fL e hemoglobina inferior a 12,0 g/dL para mulheres e 13,0 g/dL para homens, visando à simplificação do diagnóstico diferencial entre estas anemias.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 - Estabelecer, dentre os pacientes atendidos no Laboratório do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) o percentual de:

Anemias microcíticas e hipocrômicas devido à deficiência de ferro.

Anemias microcíticas e hipocrômicas devido a doenças crônicas.

Anemias microcíticas e hipocrômicas devido à β -talassemia menor.

3.2.2 - Investigar a importância do RDW na diferenciação entre anemia ferropriva, β -talassemia menor e anemia de doença crônica.

3.2.3 - Investigar a possível relação entre contagem de plaquetas, PDW, VPM e anemias microcíticas e hipocrômicas resultantes das três causas citadas.

3.2.4 - Investigar o poder de discriminação de cinco índices citados na literatura, entre estes o de Green & King (1988), para o diagnóstico diferencial entre anemia ferropriva e β -talassemia menor.

3.2.5 - Avaliar a eficiência de um novo índice desenvolvido em parceria com o Departamento de Estatística da UFMG para diferenciação entre anemia ferropriva e β -talassemia menor.

3.2.6 - Investigar as possíveis diferenças morfológicas entre as anemias microcíticas e hipocrômicas por meio de minucioso exame dos filmes sanguíneos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Foram selecionados sequencialmente, no período de agosto de 2005 a agosto de 2006, 274 pacientes com idade superior a 18 anos, com VCM inferior a 80 fL e hemoglobina inferior a 12,0 g/dL para mulheres e 13,0 g/dL para homens no Serviço de Patologia Clínica do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG), cujas amostras de sangue foram obtidas conforme descrito a seguir.

4.1.1 Classificação dos pacientes de acordo com a anemia microcítica e hipocrômica

4.1.1.1 Anemia ferropriva

Os pacientes com anemia microcítica e hipocrômica foram classificados como portadores de anemia ferropriva quando apresentaram níveis baixos de ferritina (inferiores a 6 e 28 ng/mL em mulheres e homens, respectivamente).

4.1.1.2 Anemia da doença crônica

Os pacientes com anemia microcítica e hipocrômica foram classificados, a princípio, como portadores de anemia da doença crônica quando apresentaram níveis de ferritina aumentados ou normais, capacidade total de ligação do ferro e ferro sérico normais ou diminuídos. Esses pacientes foram posteriormente avaliados quanto a seus dados clínicos e epidemiológicos quando disponíveis.

4.1.1.3 β Talassemia menor

Os pacientes com anemia microcítica e hipocrômica foram classificados como portadores de β talassemia menor quando apresentaram níveis séricos de ferritina e ferro normais, porém dosagem de hemoglobina A_2 aumentada (superior a 3,5 g/dL).

4.2 Amostra biológica

Foram obtidas amostras de sangue venoso, sendo 5mL em EDTA e 5mL sem anticoagulante. Dois filmes sanguíneos foram cuidadosamente preparados o mais rápido possível. As amostras de sangue em EDTA para eletroforese de hemoglobina e dosagem de HbA₂ e os filmes sanguíneos não corados foram encaminhados à Faculdade de Farmácia.

As amostras de sangue coletadas acima foram empregadas para:

1) Determinação dos níveis de ferritina

Método: Quimioluminescência utilizando kits Immulite 2000 da DPC[®] (Diagnostic Products Corporation) com leitura no aparelho Immulite[®] da DPC[®].

Valores de referência: 6 – 159 ng/mL (mulheres), 28 – 397 ng/mL (homens).

2) Determinação dos níveis de ferro sérico

Método: Colorimétrico utilizando kits da marca Dade Bering com leitura no aparelho Dimension AR[®] da Dade Bering.

Valor de referência: 35 -150 µg/dL.

3) Capacidade de ligação do ferro

Método: Colorimétrico utilizando kits da marca Dade Bering com leitura no aparelho Dimension AR[®] da Dade Bering.

Valor de referência: 250 – 450 µg/dL.

4) Contagem de plaquetas, PDW e VPM

Método: Contador automático Advia[®] 120 da Bayer[®].

5) Determinação do RDW

Método: Contador automático Advia[®] 120 da Bayer[®].

6) Eletroforese de hemoglobina em pH alcalino

Método: Eletroforese em pH 8,6 em cuba Fonte Eletroforese Tecnow[®] 7000.

7) Dosagem de hemoglobina A₂

Método: Eluição da fita eletroforética com determinação da concentração relativa dos diversos tipos de hemoglobinas.

8) Exame minucioso dos filmes sanguíneos

Método: Distensão sanguínea corada pelo May-Grünwald Giemsa.

4.3 Aplicação dos índices da literatura

Foram aplicados a todos os pacientes integrantes dos quatro grupos de estudo, a saber, anemia ferropriva, anemia de doença crônica, β talassemia menor e o grupo dos pacientes não classificados, os seguintes índices já descritos pela literatura: Índice de Green & King, Índice do RDW, Índice de Srivastava, Índice de Shine & Lal, Índice de Mentzer.

Além dos índices acima, foi aplicado também aos mesmos pacientes um Novo Índice (NI) desenvolvido durante o presente estudo em colaboração com o Departamento de Estatística da UFMG.

4.4 Análise estatística

Os dados foram apresentados como tabelas e gráficos (*dot plot*) e as análises estatísticas e respectivos programas utilizados foram detalhados adequadamente na Seção “Resultados”.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos pacientes

Foram coletadas amostras de 274 pacientes e determinados os níveis séricos de ferro, a capacidade total de ligação do ferro à transferrina e a ferritina, conforme descrito anteriormente. Realizou-se ainda a eletroforese de Hb de todas as amostras. Trinta pacientes foram excluídos do trabalho por apresentarem, em concomitância com a microcitose, uma hemoglobina variante detectada na eletroforese; ou, ainda, aqueles que não se enquadraram nos níveis de hemoglobina necessários à definição de anemia (inferiores a 12g/dL em mulheres e 13g/dL em homens adultos).

A partir dos resultados obtidos foi possível a distribuição, baseada nos critérios anteriormente citados, de 244 pacientes em quatro grandes grupos a saber: anemia ferropriva, anemia de doença crônica, β talassemia menor e um último grupo onde não foi possível o enquadramento dos pacientes no perfil diagnóstico compatível com qualquer uma destas três anemias, embora estes fossem anêmicos. Deste total, 83 (34,0%) foram classificados como portadores de anemia ferropriva; 53 (21,7%) como portadores de anemia de doença crônica e 23 (9,4%) como de β talassemia menor. Os outros 85 (34,9%) pacientes não puderam ser classificados em qualquer um dos três grupos pela razão acima citada.

Dentro do grupo de pacientes com anemia ferropriva, 17 (20,5%) eram do sexo masculino e 66 (79,5%) do sexo feminino. A idade variou de 20 a 81 anos, com uma média de 50 anos (Tabela 2). Sessenta e sete (80,7%) destes pacientes foram provenientes do serviço ambulatorial do Hospital sendo, então, considerados pacientes externos; 10 (12,1%) pacientes se encontravam internados ou em tratamento de quimioterapia; e, seis (7,2%) foram atendidos no serviço médico de urgência necessitando ou não de internação (Tabela 3).

No grupo dos pacientes com anemia de doença crônica, 26 (49,1%) eram do sexo masculino e 27 (50,9%) do sexo feminino. A faixa etária do grupo variou de 24 a 85 anos, com média de 58 anos (Tabela 2). Apenas quatro (7,5%) deles foram pacientes atendidos no ambulatório; 40 (75,5%) estavam internados, em tratamento de quimioterapia ou submetendo-se à hemodiálise; e, nove (17,0%) foram atendidos no serviço médico de urgência (Tabela 3).

Finalmente, no grupo de pacientes portadores de β talassemia menor, cinco (21,7%) eram do sexo masculino e 18 (78,3%) do sexo feminino. A idade dos pacientes talassêmicos variou de 26 a 77 anos, com média de 60 anos (Tabela 2). Dezoito (78,3%) foram selecionados do ambulatório; quatro (17,4%) estavam internados e um (4,3%) foi atendido no serviço médico de urgência (Tabela 3).

Tabela 2 - Caracterização dos pacientes atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) com relação à média de idade (idades mínima e máxima) e ao sexo.

Tipo de anemia	Idade (anos)	Sexo		Total (n=159)
		Masculino (n=48)	Feminino (n=111)	
AF	50 (20-81)	17 (20,5%)	66 (79,5%)	83
ADC	58 (24-85)	26 (49,1%)	27 (50,9%)	53
β -Tal	60 (26-77)	5 (21,7%)	18 (78,3%)	23

AF - anemia ferropriva, ADC - anemia de doença crônica, β -Tal - β talassemia menor.

Tabela 3 - Caracterização dos pacientes atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) quanto ao local de procedência.

Tipo de anemia	Internados (n=54)	Externos (n=89)	Outros* (n=16)	Total (n=159)
AF	10 (12,1%)	67 (80,7%)	6 (7,2%)	83
ADC	40 (75,5%)	4 (7,5%)	9 (17,0%)	53
β -Tal	4 (17,4%)	18 (78,3%)	1 (4,3%)	23

AF - anemia ferropriva, ADC - anemia de doença crônica, β -Tal - β talassemia menor.

* - Serviço Médico de Urgência.

5.2 Análise de parâmetros hematimétricos

Posteriormente à caracterização dos pacientes, realizou-se uma análise estatística prévia de vários parâmetros obtidos no contador hematológico ADVIA 120, no intuito de se verificar possíveis diferenças estatisticamente significativas que pudessem contribuir para a diferenciação entre os três grupos. Foram analisados os seguintes parâmetros do hemograma: número de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose eritrocitária (RDW); e a série plaquetária incluindo o número de plaquetas, volume plaquetário médio (VPM) e índice de anisocitose plaquetária (PDW).

As análises estatísticas foram realizadas nos programas Sigma 2.03 e Prisma 4, usando ANOVA para investigar a presença de diferença significativa entre os grupos e posteriormente, o teste de Tukey para localizar a diferença no caso dos dados paramétricos. Na comparação de dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido da aplicação do teste de Dunn's. Valores de $p < 0,01$ foram considerados estatisticamente significativos. Na Tabela 4 encontram-se os valores dos vários parâmetros hematológicos levados em consideração na análise estatística.

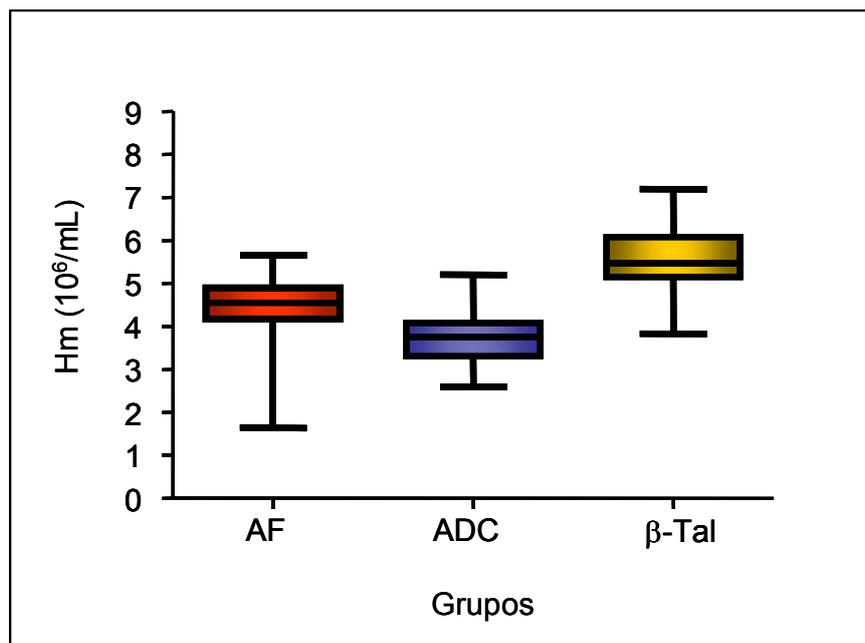
Tabela 4 – Parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de anemia ferropriva (AF), anemia de doença crônica (ADC) e β talassemia menor (β -Tal) atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG).

Parâmetros	AF (n=83) Média \pm DP	ADC (n=53) Média \pm DP	β -Tal (n=23) Média \pm DP
Hemácias ($10^6/\mu\text{L}$)	4,51 \pm 0,6 ^b	3,72 \pm 0,6	5,53 \pm 0,8 ^{a, b}
Hemoglobina (g/dL)	9,9 \pm 1,2	9,3 \pm 1,3	11,7 \pm 1,4 ^{a, b}
VCM (fL)	70,7 \pm 4,4	76,4 \pm 3,5 ^{a, c}	66,7 \pm 5,2
HCM (pg)	22,1 \pm 2,2	25,2 \pm 2,0 ^{a, c}	21,4 \pm 2,1
CHCM (g/dL)	31,2 \pm 1,8	32,9 \pm 1,8 ^a	32,1 \pm 1,3
RDW (%)	16,4 \pm 1,6	16,0 \pm 2,4	15,6 \pm 1,7
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	316,78 \pm 103,8	333,75 \pm 195,8	252,91 \pm 116,8
VPM (fL)	7,8 \pm 0,8	7,7 \pm 1,4	7,7 \pm 0,8
PDW (%)	45,5 \pm 11,9	53,5 \pm 12,5 ^{a, c}	43,5 \pm 10,1

VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW - índice de anisocitose eritrocitária, VPM - volume plaquetário médio, PDW - índice de anisocitose plaquetária, a - diferença significativa com o grupo AF, b - diferença significativa com o grupo ADC, c - diferença significativa com o grupo β -Tal.

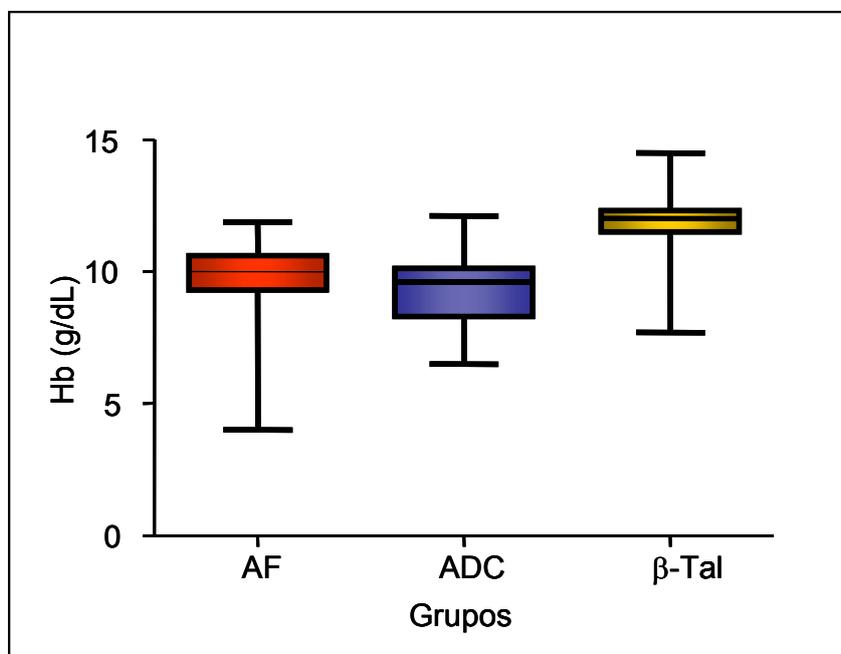
Com a finalidade de se observar a dispersão de valores dos vários parâmetros e compará-la entre os três grupos, foram construídos gráficos de *box-plot* para cada um destes. Este tipo de gráfico também fornece informações importantes sobre o conjunto de dados, como simetria e variabilidade. Se a amplitude for muito maior que a distância interquartílica e a mediana estiver mais próxima do primeiro do que do terceiro quartil, há fortes indicações de assimetria positiva e de grande dispersão das observações (Figuras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11).

Figura 3 - Número de hemácias na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal). As extremidades de cada *box-plot* correspondem ao primeiro e terceiro quartis e a linha dentro do *box* representa a mediana.



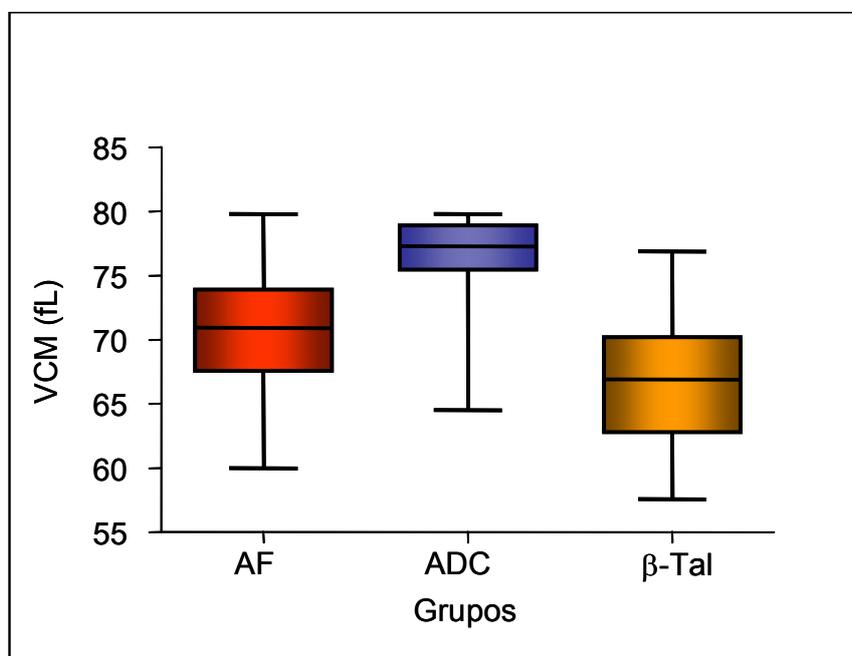
Para o parâmetro número de hemácias foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p < 0,001$); o que pode ser visualizado pela mínima sobreposição de dados de um *box* se comparado a outro. É possível ainda verificar que o grupo ADC apresentou-se com a maior simetria e menor dispersão dos dados devido à mediana se localizar aproximadamente no meio do *box* e os dados se disporem em um intervalo menor de valores entre o mínimo e o máximo.

Figura 4 - Valores de hemoglobina (Hb) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



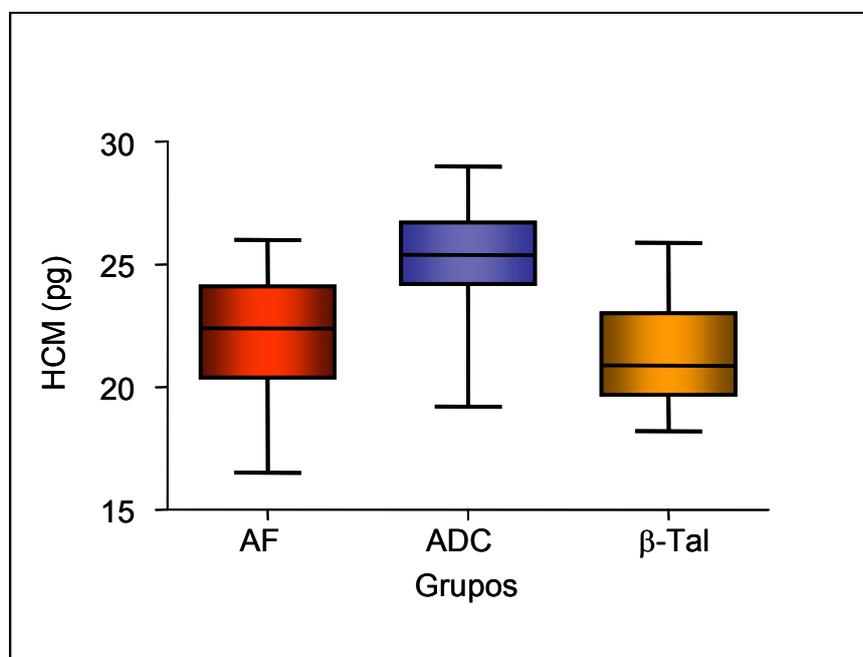
De maneira semelhante ao observado para número de hemácias, o parâmetro hemoglobina apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos AF se comparado ao grupo β -Tal ($p < 0,001$) e ADC se comparado à β -Tal ($p < 0,001$). Tais resultados foram ilustrados no gráfico de *box-plot* ocorrendo somente uma pequena sobreposição de dados de um grupo e outro. O mesmo não foi encontrado entre o grupo AF e ADC que ao nível de 1% não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0,01$), o que pode ser observado por uma maior área de interface dos dados dos respectivos grupos. Foi observado ainda que para o parâmetro hemoglobina os três grupos apresentaram pouca simetria e considerável dispersão de valores. No grupo ADC os dados se dispuseram em um intervalo menor de valores entre o mínimo e o máximo, contudo a mediana se encontra em posição excêntrica. No grupo β -Tal a mediana se encontra ligeiramente excêntrica e há grande intervalo de valores entre o mínimo e o máximo. No grupo AF apesar da mediana se encontrar na metade do *box* existe uma grande variação entre os valores mínimo e máximo obtidos para a hemoglobina neste grupo.

Figura 5 - Volume corpuscular médio (VCM) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



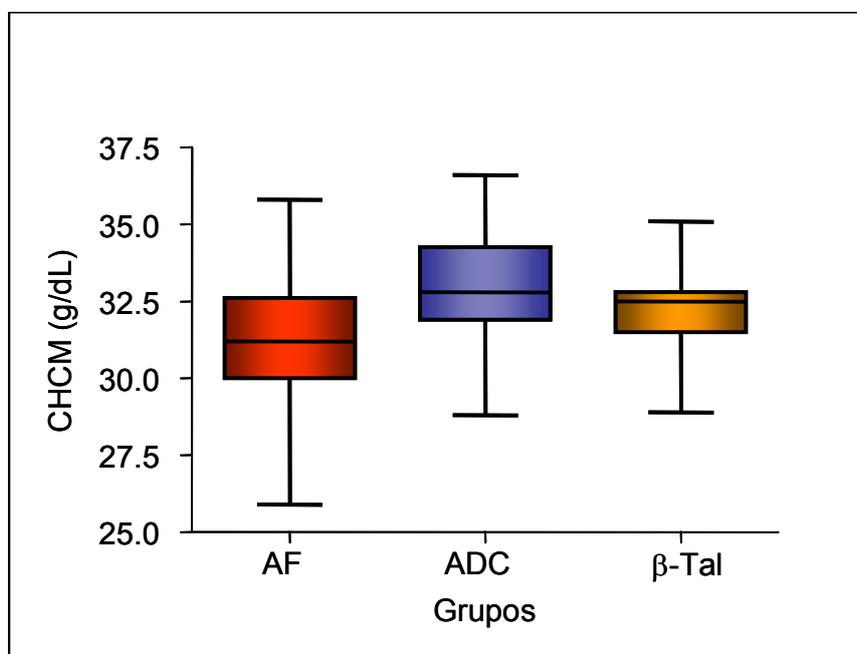
No caso do parâmetro volume corpuscular médio também foi constatada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ADC e β -Tal ($p < 0,001$) e entre ADC e AF ($p < 0,001$) observadas pela presença de área de sobreposição mínima entre os referidos grupos. Contudo, entre os grupos AF e β -Tal não foi verificada diferença estatisticamente significativa ao nível de 1%. Tal fato se mostrou em concordância com a análise do gráfico de *box-plot*, onde expressiva parte dos dados de um grupo e outro apresentou valores comuns. Em relação à simetria e à dispersão, foi representada no gráfico de *box-plot*, uma marcante assimetria e grande dispersão de dados no grupo ADC pelos motivos já citados anteriormente.

Figura 6 - Hemoglobina corpuscular média (HCM) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



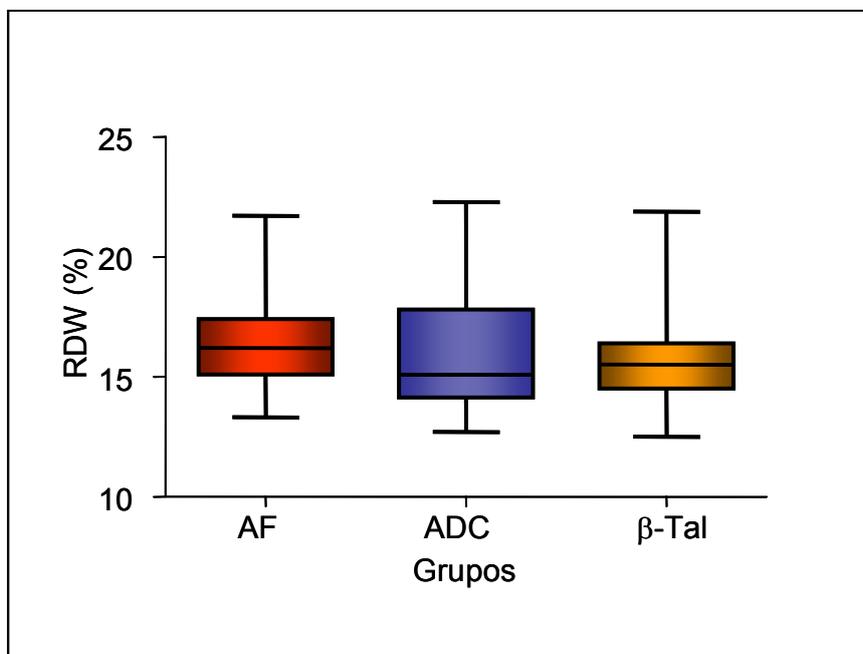
Para o parâmetro hemoglobina corpuscular média verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ADC e β -Tal ($p < 0,001$) e entre ADC e AF ($p < 0,001$). Contudo não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos AF e β -Tal ($p = 0,394$). Tal conclusão também pode ser visualizada no gráfico de *box-plot* pela mínima sobreposição de dados verificada quando se compara o grupo ADC aos grupos AF e β -Tal. Porém, o mesmo não ocorreu na comparação entre AF e β -Tal onde foi observada grande sobreposição de valores. O grupo β -Tal apresentou uma simetria menor e uma dispersão de dados discretamente maior que os demais grupos.

Figura 7 - Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



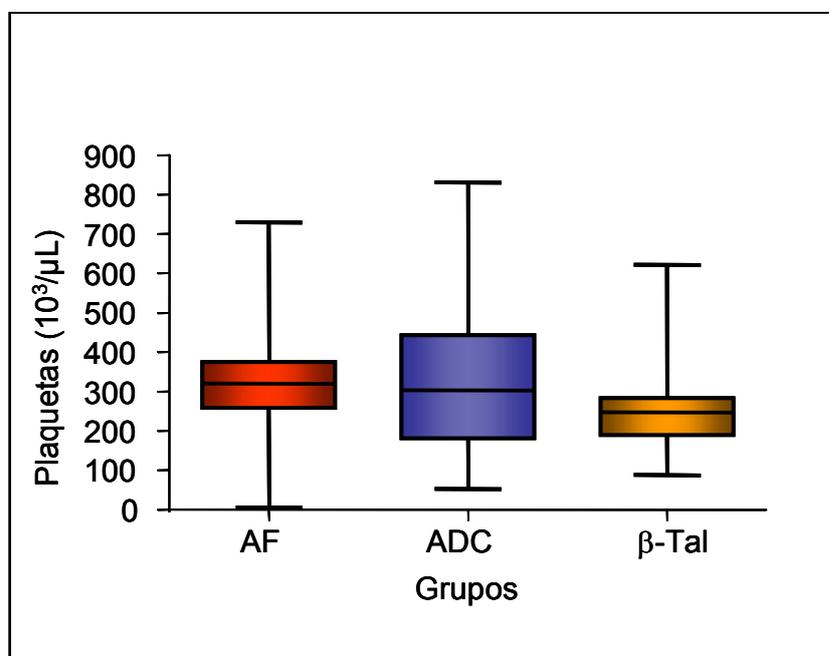
O parâmetro concentração de hemoglobina corpuscular média apresentou diferença estatisticamente significativa apenas entre os grupos ADC e AF ($p < 0,001$), o que pode ser visualizado pela pequena área de sobreposição de valores. Entre ADC e β -Tal não houve diferença estatisticamente significativa ($p = 0,143$), o mesmo ocorrendo entre AF e β -Tal ($p = 0,079$). Esta conclusão foi confirmada na análise do gráfico de *box-plot* onde grande área de valores mostrou-se com sobreposição. Também foi possível a verificação de assimetria e dispersão um pouco maiores nos dados do grupo β -Tal se comparados aos outros grupos.

Figura 8 - Anisocitose eritrocitária (RDW) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



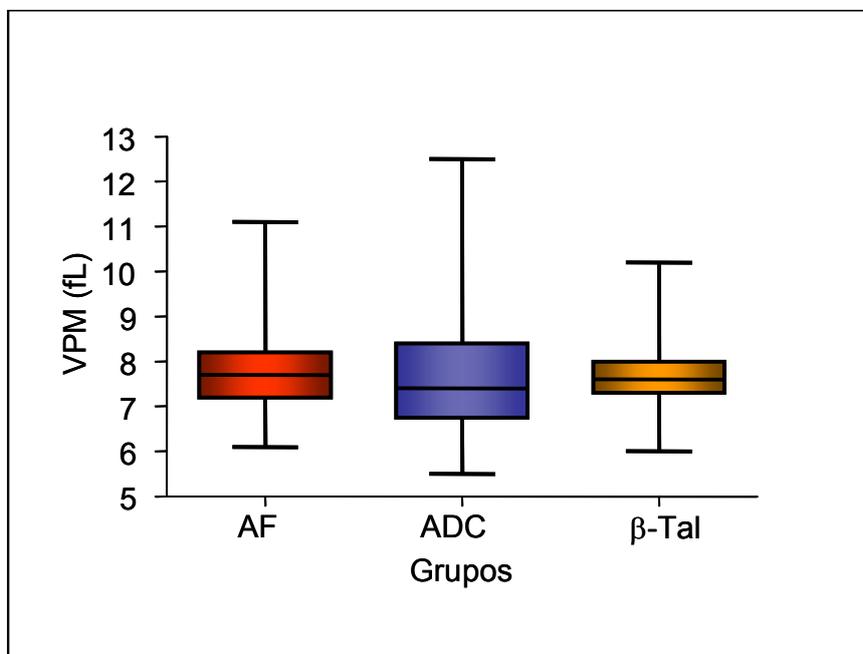
O parâmetro RDW, que reflete a anisocitose eritrocitária, apresentou uma grande sobreposição de dados entre todos os três grupos como mostra o gráfico de *box-plot* do referido índice. Isto está de acordo com a análise estatística a qual não revelou diferença entre os grupos ($p=0,042$) ao nível de significância de 1%. O grupo ADC, dentre os três grupos, apresentou a maior dispersão e assimetria de dados.

Figura 9 – Número de plaquetas na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



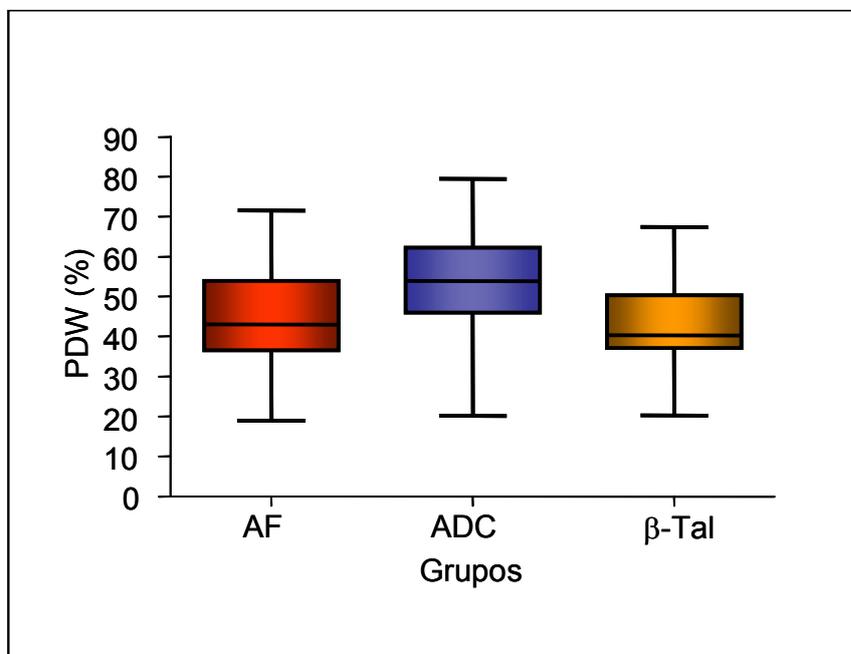
No caso do número de plaquetas, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao nível de 1% entre os três grupos ($p=0,011$) o que se mostrou em concordância com a análise do gráfico de *box-plot* onde foi observada extensa área de sobreposição de dados entre os três grupos. A dispersão e a assimetria de dados do número de plaquetas no grupo ADC se mostraram levemente maiores que o grupo AF e β -Tal.

Figura 10 – Volume plaquetário médio (VPM) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



O parâmetro volume plaquetário médio não apresentou diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos ($p=0,280$) como visualizado no gráfico de *box-plot* através da larga região de sobreposição entre grupos. O grupo ADC apresentou, para o parâmetro VPM, a maior assimetria e dispersão de valores se comparado aos demais grupos.

Figura 11 – Anisocitose plaquetária (PDW) na anemia ferropriva (AF), na anemia de doença crônica (ADC) e na β talassemia menor (β -Tal).



Em relação ao parâmetro PDW observou-se a presença de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ADC x β -Tal ($p=0,007$) e ADC x AF ($p=0,001$). A análise feita para o grupo AF x β -Tal não mostrou diferença estatisticamente significativa ($p=0,822$) sendo tal conclusão visualizada pela grande sobreposição gráfica dos valores de tais grupos. O grupo β -Tal mostrou assimetria e dispersão discretamente maiores em comparação aos grupos AF e ADC.

5.3 Tentativa de obtenção de um novo índice para a discriminação entre anemia ferropriva e β talassemia menor

Os valores de todos os parâmetros hematimétricos dos pacientes envolvidos neste estudo foram encaminhados ao Serviço de Estatística da UFMG no intuito de verificar o possível estabelecimento de um novo índice para diferenciação entre anemia ferropriva e β talassemia menor ou, ainda, que pudesse discriminar os três grupos de anemias microcíticas e hipocrômicas. Além disso, esperava-se que tal fórmula discriminante apresentasse grandes percentuais de sensibilidade e especificidade, preferencialmente superiores ao Índice de Green & King, o qual mostrou maior eficiência dentre os índices testados.

Para a criação deste novo índice foram empregadas a Análise de Discriminante de Fisher e também a plotagem da curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*). A Análise de Discriminante é uma técnica utilizada para a classificação dos elementos de uma amostra ou população. Para a sua aplicação, é necessário que os grupos para os quais cada elemento amostral pode ser classificado, sejam bem definidos e conhecidos “a priori”, de acordo com suas características gerais. Com isso, o conhecimento sobre os grupos permite a elaboração de uma função matemática, fundamentada na teoria das probabilidades, para classificar um novo elemento.

Algumas medidas de acurácia e suas propriedades, entre estas o poder discriminativo, são utilizadas para diferenciar entre modelos distintos que estão avaliando os mesmos resultados ou entre diferentes versões do mesmo modelo prognóstico. O poder discriminativo de um modelo é a sua habilidade de distinguir de forma precisa entre aqueles indivíduos que se apresentam ou não com um determinado resultado. A discriminação pode ser avaliada por muitos métodos incluindo sensibilidade, especificidade, valores preditivos, razão de verossimilhança e a área sob a curva ROC. A curva ROC constitui um método estatístico gráfico que avalia a acurácia diagnóstica de um marcador (teste diagnóstico) para distinguir entre duas populações. Esta curva é uma técnica indicada para escolher os pontos de corte (*cut-offs*) mais adequados de um determinado teste, segundo seus níveis de sensibilidade e especificidade. O melhor valor de *cut-off* é o ponto na curva ROC onde a combinação

de sensibilidade e especificidade são máximas. Basicamente, a área sob a curva ROC reflete a probabilidade com que um modelo prognóstico discriminará corretamente entre dois indivíduos quando um deles tem o evento em questão e o outro não. A área sob a curva ROC é um valor que varia entre zero e um. Um valor de 0,50 significa que o modelo proposto não pode discriminar melhor do que qualquer ferramenta usada de maneira aleatória; enquanto o valor de um (1) representa uma perfeita discriminação. Um marcador biológico que possui uma área sob a curva ROC de um (1) diferenciará perfeitamente indivíduos doentes (sensibilidade igual a um) dos saudáveis (especificidade igual a um) (HANLEY & MCNEIL, 1982; MARGOLIS *et al.*, 2002; FLUSS *et al.*, 2005; PERKINS & SCHISTERMAN, 2006).

Um requisito para a utilização da função discriminante de Fisher é que as variáveis indicadas para compor o índice tenham distribuição normal nos dois grupos de pessoas separadamente e que a distribuição conjunta destas variáveis seja normal multivariada. No caso dos parâmetros do hemograma apenas o número de hemácias, VCM e CHCM possuem distribuição normal. Estas variáveis foram cruzadas duas a duas indicando haver uma possível relação linear elíptica entre todas elas. Posteriormente, procedeu-se à seleção de variáveis na análise discriminante, ou seja, a escolha das variáveis do índice foi feita pelo método *stepwise*.

Finalmente, o índice final ajustado apresentou a seguinte fórmula:

$$I = 1,91xHm + 0,44xCHCM$$

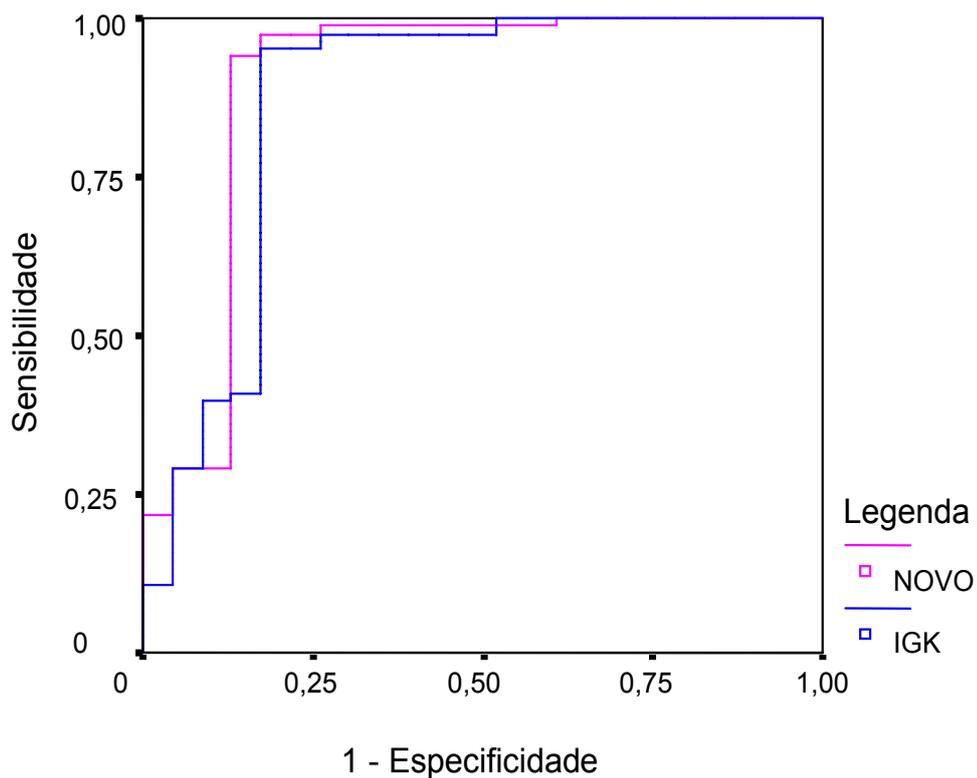
O novo índice apresentou um ponto de corte com o valor de 23,85. Se o valor encontrado para um determinado paciente é menor que 23,85, este é classificado como portador de anemia ferropriva, enquanto valores superiores a 23,85 classificam o indivíduo como portador de β talassemia menor.

As estimativas de sensibilidade e de especificidade do teste para anemia ferropriva, usando o ponto de corte citado foram 0,94 e 0,87, respectivamente; enquanto as estimativas destes parâmetros para o Índice de Green & King foram 0,95 e 0,78, respectivamente.

Com o objetivo de fazer uma comparação mais “refinada” do índice obtido com o já conhecido IGK, foi feita a curva ROC para os dois índices usando o programa SPSS

12.0.1 (Figura 12). Aquele índice que apresenta maior área sob a curva é o que melhor discrimina os dois grupos.

Figura 12 - Curvas ROC para o Índice de Green & King e o Novo Índice calculado.



IGK - Índice de Green & King.

As áreas sob a curva foram 0,868 e 0,895 para o Índice de Green & King e o Novo Índice (NI), respectivamente.

5.3.1 Tentativa de obtenção de índices para anemia ferropriva, anemia de doença crônica e β talassemia menor

Ainda com base no banco de dados coletado e nas técnicas de análise discriminante foram construídas três equações, na tentativa de se discriminar não somente anemia ferropriva de β talassemia menor, mas também a anemia de doença crônica que pode cursar com microcitose e hipocromia. Na construção de tais fórmulas foram novamente utilizadas a função discriminante e as variáveis número de hemácias, VCM e CHCM que não violaram a suposição de normalidade bivariada. Desta forma, foram encontradas as três equações para cada uma das três anemias microcíticas e hipocrômicas (Tabela 5).

Tabela 5 - Equações para diferenciação entre anemia ferropriva, anemia de doença crônica e β talassemia menor.

Grupo	Regra
Anemia ferropriva	$K_1 = 421,20 - 37,20 \times Hm - 4,55 \times VCM - 11,26 \times CHCM$
Anemia de doença crônica	$K_2 = 438,74 - 36,07 \times Hm - 4,76 \times VCM - 11,46 \times CHCM$
β talassemia menor	$K_3 = 454,26 - 40,24 \times Hm - 4,39 \times VCM - 12,14 \times CHCM$

Hm - número de hemácias, VCM - volume corpuscular médio, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média.

Foram calculados, então, para todos os pacientes do banco de dados os valores correspondentes a K_1 , K_2 e K_3 . Se o valor de K_1 foi o maior dentre os três, o paciente foi classificado como portador de anemia ferropriva. No caso de K_2 ser a constante de maior valor dentre as outras, o paciente foi classificado como portador de anemia de doença crônica. E, finalmente, um valor de K_3 superior às demais constantes enquadra o paciente no grupo da β talassemia menor.

Este “índice” para a diferenciação dos três grupos de anemias microcíticas e hipocrômicas apresentou, quando testado nos pacientes deste estudo, uma proporção

de acertos de 0,786, ou seja, quando aplicado a uma nova população de pacientes com estes tipos de anemia, fará a classificação correta destes, em 78,6% das vezes. Uma relativa baixa proporção de acertos foi influenciada pela semelhança verificada entre os grupos de pacientes com anemia ferropriva e anemia de doença crônica.

5.4 Análise de vários índices na discriminação entre anemia ferropriva e β talassemia menor

Várias fórmulas constantes na literatura foram avaliadas quanto à sua eficiência na distinção entre anemia ferropriva e β talassemia menor. Os Índices Green & King, Shine & Lal, Srivastava, Mentzer, Índice do RDW e o Novo Índice criado (NI) foram testados para todos os grupos de anemias microcíticas e hipocrômicas, incluindo-se o grupo de pacientes com anemia de doença crônica e também o grupo de pacientes não classificados, porém, portadores de um quadro de anemia (estes não se enquadravam perfeitamente em qualquer um dos três grupos, possivelmente por apresentarem concomitância de anemias e, por isso, foram excluídos da maioria das análises do presente estudo).

Apesar do uso de seis fórmulas discriminantes, nenhuma destas conseguiu diagnosticar corretamente todos os pacientes portadores de anemia ferropriva. Um (1) dos pacientes deste grupo apresentou valores de todas as fórmulas e das constantes “k” compatíveis com talassemia menor.

O Índice de Green & King conseguiu classificar corretamente o maior número de pacientes portadores de anemia ferropriva; foram 79 pacientes correspondentes a 95,2% do total do grupo anemia ferropriva. O Novo Índice criado, NI, mostrou uma mínima diferença no número de acertos se comparado ao Índice de Green & King. Este índice obteve um total de acertos de 78 pacientes representando 94,0% do respectivo grupo. Em terceiro lugar, o Índice de Mentzer corretamente diagnosticou 72 dos 83 pacientes portadores de anemia ferropriva, um percentual de 86,7%. Em seguida ao Índice de Mentzer, o Índice do RDW, com um número de acertos de 69 correspondentes a 83,1% do grupo anemia ferropriva. O quinto índice em número de acertos foi o Índice de Srivastava que classificou de maneira correta 57 pacientes, o

que representa 68,7% do grupo. E, em último lugar, diagnosticando o menor número de pacientes corretamente, o Índice de Shine & Lal. Tal índice teve somente quatro acertos representando um percentual de apenas 4,8% (Tabela 6).

No grupo de pacientes portadores de β talassemia menor, o melhor índice foi a fórmula criada por Shine & Lal que apresentou 100% de acertos, correspondendo a 23 pacientes. Em segundo lugar, o Novo Índice criado (NI), diagnosticou corretamente 20 pacientes o que corresponde a 87% do total de pacientes do referido grupo. Em seguida, o Índice do RDW obteve 19 acertos correspondentes a um percentual de 82,6% do grupo. O quarto índice com maior número de acertos foi o Índice de Green & King o qual proporcionou um correto diagnóstico de 18 pacientes representando 78,3% do grupo portador de β talassemia menor. O Índice de Srivastava obteve 17 acertos, um percentual de 73,9%. O Índice de Mentzer foi aquele com menor número de acertos corretamente diagnosticando 16 pacientes, o que corresponde a 69,6% do grupo (Tabela 6).

Tabela 6 - Pacientes (em números absolutos e valores percentuais) corretamente diagnosticados pelos índices testados.

Índice	AF (n=83)	β -Tal (n=23)
IGK	79 (95,2%)	18 (78,3%)
NI	78 (94,0%)	20 (87,0%)
S	57 (68,7%)	17 (73,9%)
IRDW	69 (83,1%)	19 (82,6%)
SL	04 (4,8%)	23 (100%)
IM	72 (86,7%)	16 (69,6%)

AF - anemia ferropriva, β -Tal - β talassemia menor, IGK - Índice de Green & King, NI - Novo Índice, S - Índice de Srivastava, IRDW - Índice do RDW, SL - Índice Shine e Lal, IM - Índice de Mentzer.

Com o objetivo de melhor comparar a qualidade intrínseca dos índices e avaliar o seu poder discriminatório na diferenciação entre anemia ferropriva e β talassemia menor, os parâmetros sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência foram calculados. A sensibilidade é definida como a probabilidade de o teste ser positivo sabendo-se que o paciente examinado é doente, ou seja, mede a capacidade de reatividade do teste em um paciente doente. A sensibilidade é calculada dividindo-se o número de pacientes verdadeiros positivos diagnosticados pelo teste, pelo número de verdadeiros positivos somados aos falsos negativos dentro do grupo de pacientes doentes. A especificidade se refere à probabilidade de o teste ser negativo sabendo-se que o paciente examinado não é portador da doença, ou seja, a não reatividade do teste em pacientes não portadores da doença. Tal medida pode ser obtida pela razão entre os verdadeiros negativos apresentando resultado do teste negativo, pelo número de verdadeiros negativos acrescidos dos falsos positivos dentro do grupo de não doentes. O valor preditivo positivo é a probabilidade do paciente estar realmente doente quando o resultado do teste é positivo. O valor de predição positiva é obtido dividindo-se a freqüência dos verdadeiros positivos, oriundos de pacientes doentes, pelo total de casos positivos diagnosticados pelo teste. O valor preditivo negativo informa a probabilidade do paciente não estar doente quando o resultado do teste é negativo. O VPN é calculado dividindo-se a freqüência dos verdadeiros negativos, provenientes de pacientes não doentes, pelo total de casos negativos obtidos pelo teste em questão. Os valores de VPP e VPN ajudam a decisão da equipe médica que, ao receber um paciente com resultado positivo do teste, precisa avaliar se o paciente está ou não doente. Contudo, ambos VPP e VPN, dependem da prevalência da doença na população de interesse e conseqüentemente não podem ser generalizados a populações diferentes. Com relação ao parâmetro eficiência, este mostra que um teste eficiente diagnostica como positivo os verdadeiros positivos e como negativo os verdadeiros negativos. A eficiência é calculada dividindo-se a soma de verdadeiros negativos aos verdadeiros positivos, pelo número de verdadeiros positivos, verdadeiros negativos, falsos positivos e falsos negativos (PEKKANEN & PEARCE, 1999; SOARES & SIQUEIRA, 2002).

Posteriormente, procedeu-se à plotagem de curvas “Receiver Operator Characteristic” - (ROC), uma vez que a maior área sob a curva indica o índice com maior probabilidade de discriminar corretamente os pacientes portadores de uma das referidas anemias.

Além dos parâmetros sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e área sob a curva ROC foi também calculado o índice de Youden para a diferenciação entre β talassemia menor e anemia ferropriva. Embora a área sob a curva ROC seja o parâmetro mais comumente utilizado para avaliar a acurácia diagnóstica de um teste, o índice de Youden também tem sido usado na prática. O índice de Youden fornece uma apropriada medida da validade de uma técnica ou determinada questão. Este índice depende da sensibilidade e especificidade, não levando em consideração os valores preditivos positivo e negativo uma vez que estes valores estão estreitamente relacionados com a prevalência da doença analisada. Assim, o índice de Youden se mostra o mais imparcial na medida do efeito. O índice de Youden é obtido somando-se os valores de sensibilidade e especificidade e subtraindo-se desta soma 100. Um valor para tal índice próximo a zero sugere que o método utilizado não é melhor que qualquer técnica usada ao acaso (PEKKANEN & PEARCE, 1999; DEMIR *et al.*, 2002; FLUSS *et al.*, 2005; ALFADHLI *et al.*, 2006).

O Índice de Shine & Lal apresentou 100% de sensibilidade no diagnóstico da β talassemia menor. O segundo maior valor de sensibilidade para β talassemia menor foi de 87% e se refere ao Novo Índice criado neste estudo (NI). Logo depois do NI, seguiu-se o Índice do RDW com uma sensibilidade de 82,6%. O Índice de Green & King obteve o quarto melhor valor de sensibilidade no diagnóstico da β talassemia menor, sendo este de 78,3%. Para o Índice de Srivastava a sensibilidade foi de 73,9%. E, finalmente, o índice com menor sensibilidade diagnóstica para β talassemia menor foi o Índice de Mentzer com um valor de apenas 69,6% para este parâmetro (Tabela 7).

Com relação à especificidade no diagnóstico da β talassemia menor, o Índice de Green & King apresentou o maior valor para este parâmetro dentre as demais fórmulas discriminantes, a saber 95,2%, valor este apenas discretamente superior ao observado para o índice recém criado (NI) cuja especificidade foi de 94%. O terceiro maior valor de especificidade pertenceu ao Índice de Mentzer, correspondendo a 86,7%. Em seguida,

o Índice do RDW apresentou a quarta melhor especificidade diagnóstica para β talassemia menor, um valor de 83,1%. O Índice de Srivastava obteve um valor de especificidade de 68,7%. A menor especificidade para diagnosticar a β talassemia menor foi encontrada na aplicação da fórmula de Shine & Lal. Tal índice obteve uma especificidade de apenas 4,8% (Tabela 7).

Ao se analisar o parâmetro valor preditivo positivo, foi observado que o maior valor encontrado para o diagnóstico da β talassemia menor pertenceu ao Índice de Green & King, valor este de 81,8%; sendo que o Novo Índice, NI, apresentou o segundo maior VPP somente ligeiramente menor que o de Green & King, sendo este valor de 80%. O menor VPP foi encontrado no Índice de Shine & Lal correspondendo a um valor de 22,5% (Tabela 7).

Na análise do VPN foi verificado que o Índice de Shine & Lal apresentou um valor de 100% para este parâmetro. O segundo maior VPN foi encontrado na aplicação do Novo Índice (NI), sendo um valor relativamente alto de 96,3%. O valor mais baixo de VPN foi observado no Índice de Srivastava, sendo de 90,5% (Tabela 7).

O índice que apresentou a maior eficiência no diagnóstico da β talassemia menor foi, para grande satisfação, o Novo Índice (NI), cujo valor para este parâmetro foi de 92,4%, sendo que o Índice de Green & King ocupou o segundo lugar, obtendo 91,5% de eficiência. A menor eficiência foi observada para o Índice de Shine & Lal (25,5%) (Tabela 7).

Com a finalidade de proporcionar um possível aumento nos valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e, conseqüentemente, melhorar a acurácia na diferenciação da anemia ferropriva e da β talassemia menor, foi testada uma combinação de dois índices diagnósticos, os quais foram Índice de Green & King e o Novo Índice criado (NI).

A combinação dos dois índices mostrou resultados satisfatórios se comparados os novos valores de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN e eficiência com os valores encontrados para cada um dos dois índices aplicados isoladamente. Tal combinação permitiu, ainda, o encontro dos maiores valores para todos os parâmetros citados anteriormente com exceção da sensibilidade e valor preditivo negativo do Índice de Shine & Lal cujos valores atingem 100% (Tabela 7).

Em seguida, foram determinadas e comparadas as áreas sob a curva ROC de todos os seis índices testados. Com grande satisfação foi verificado que o Novo Índice criado (NI) apresentava a maior área sob a curva ROC, um valor de 0,895, provando ser, assim, o índice que possui a maior probabilidade de diagnosticar corretamente um paciente portador de β talassemia menor ou anemia ferropriva. A segunda maior área sob a curva foi observada para o Índice de Green & King correspondendo a um valor de 0,868. O índice que apresentou menor área sob a curva foi o Índice de Shine & Lal com um valor de apenas 0,678 (Tabela 8).

Finalmente, os valores do índice de Youden foram calculados para cada função discriminante. Também usando o índice de Youden, o Novo Índice criado (NI) mostrou ser a função discriminante com a maior validade diagnóstica para diferenciar corretamente entre β talassemia menor e anemia ferropriva (índice de Youden = 81). O segundo melhor índice apresentando um valor de índice de Youden de 73,5 foi a fórmula de Green & King. De forma semelhante ao verificado para a área sob a curva ROC, a função discriminante de Shine & Lal mostrou o menor valor (4,8) para o índice de Youden (Tabela 8).

Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e eficiência de alguns índices na discriminação entre anemia ferropriva (AF) e β talassemia menor (β -Tal).

Índice	Sensibilidade(%)	Especificidade(%)	VPP(%)	VPN(%)	Eficiência(%)
IGK					
AF	95,2	78,3	94,0	81,8	91,5
β -Tal	78,3	95,2	81,8	94,0	
NI					
AF	94,0	87,0	96,3	80,0	92,4
β -Tal	87,0	94,0	80,0	96,3	
S					
AF	68,7	73,9	90,5	39,5	69,8
β -Tal	73,9	68,7	39,5	90,5	
IRDW					
AF	83,1	82,6	94,5	57,6	83,0
β -Tal	82,6	83,1	57,6	94,5	
SL					
AF	4,8	100	100	22,5	25,5
β -Tal	100	4,8	22,5	100	
IM					
AF	86,7	69,6	91,1	59,3	83,0
β -Tal	69,6	86,7	59,3	91,1	
IGK+NI					
AF	97,6	87,0	96,4	90,9	95,3
β -Tal	87,0	97,6	90,9	96,4	

IGK - Índice de Green & King, NI - Novo Índice, S - Índice de Srivastava, IRDW - Índice do RDW, SL - Índice Shine & Lal, IM - Índice de Mentzer.

Tabela 8 - Valores de áreas sob a curva ROC e índice de Youden para as funções discriminantes testadas.

Índice	Área sob a curva ROC	Índice de Youden
IGK	0,868	73,5
NI	0,895	81,0
S	0,775	42,6
IRDW	0,852	65,7
SL	0,678	4,8
IM	0,835	56,3

IGK - Índice de Green & King, NI - Novo Índice, S - Índice de Srivastava, IRDW - Índice do RDW, SL - Índice Shine & Lal, IM - Índice de Mentzer.

Apesar de todos os índices testados terem sido criados para a diferenciação entre talassemia menor e anemia ferropriva, estes foram testados no grupo de pacientes portadores de anemia de doença crônica, uma vez que esta patologia também pode cursar com microcitose e hipocromia. O comportamento dos índices neste grupo mostrou que, com exceção de um (1) paciente dos 53 componentes do grupo, pelo menos um dos seis índices apresentou resultados compatíveis com anemia ferropriva. A constante K_2 foi superior a K_1 e K_3 em 42 pacientes deste grupo, o que se mostra condizente com o diagnóstico de anemia de doença crônica.

Os índices e as constantes também foram testados no grupo de pacientes que, apesar de possuídores de um quadro de anemia, não puderam ser enquadrados em um dos três grupos analisados, com base nos resultados dos exames padrão-ouro. Este grupo apresentou, de maneira paradoxal, o maior número de pacientes (85 pacientes) se comparados os quatro grupos, superior até mesmo ao grupo anemia ferropriva com 83 pacientes; sendo, desta forma, importante analisá-los. Os resultados da aplicação destas fórmulas foram extremamente variados e apenas em dois pacientes os

resultados de todas as seis fórmulas e da constante K foram concordantes entre si classificando os referidos pacientes como portadores de talassemia menor. Em 38 pacientes, a constante K, os classificou como portadores de anemia de doença crônica, enquanto os índices os classificavam no grupo anemia ferropriva ou no grupo talassemia menor, fato este, que leva à suposição de concomitância de doenças nos pacientes deste grupo, impossibilitando a concordância de diagnósticos.

5.5 Variação do valor de *cut-off* para o Índice de Green & King

Os pesquisadores Green & King testaram a função discriminante de sua própria autoria utilizando um contador automático Coulter S + IV. Para este aparelho o nível de decisão numérica (*cut-off*) determinado empiricamente a partir do qual se considerava um paciente como portador de β talassemia menor ou anemia ferropriva foi de 65. Adicionalmente, algumas amostras testadas por Green & King no contador automático Coulter S + IV foram também analisadas nos aparelhos Sysmex E-5000 e Technicon H*1 e os valores dos respectivos *cut-offs* obtidos de maneira empírica. Para os últimos este valor foi de 73. Assim, foi observada uma ligeira variação no nível de decisão dos três instrumentos que poderia estar relacionada ao princípio do sistema de detecção utilizado nestes aparelhos que se apresenta diferente em todos; à seleção ou truncação dos eventos incluídos na análise dos eritrócitos e aos fatores de calibração. Consequentemente, estes autores recomendaram que cada laboratório determinasse seu próprio valor de *cut-off*, pois este poderia se desviar levemente daqueles observados em seu estudo (GREEN & KING, 1989).

No presente trabalho, ao ser plotada a curva ROC do Índice de Green & King, foi verificado que um valor de 66,3, discretamente diferente daquele verificado no trabalho original de Green & King (1989), possibilitaria um nível maior de acurácia desta fórmula, refletida em alguns parâmetros, na diferenciação entre anemia ferropriva e β talassemia menor. Utilizando-se o *cut-off* de 66,3, o Índice de Green & King diagnosticou corretamente 19 pacientes talassêmicos, um (1) paciente a mais se comparado ao diagnosticado com valor de *cut-off* de 65. No grupo anemia ferropriva o número de pacientes corretamente diagnosticados permaneceu o mesmo para ambos os valores

de *cut-off*. Os parâmetros de acurácia diagnóstica determinados a partir do valor limite 66,3 foram os seguintes: sensibilidade – 82,6%; especificidade – 95,2% (a mesma encontrada com o valor de 65); VPN – 95,2%; VPP – 82,6%; eficiência – 92,4 %; área sob a curva ROC – 0,868 (permaneceu a mesma independente do valor de *cut-off*) e índice de Youden – 77,8. Mesmo utilizando-se o valor de *cut-off* de 66,3 para o Índice de Green & King, o Novo Índice (NI) criado neste trabalho apresentou resultados maiores para a área sob a curva ROC, índice de Youden, sensibilidade e VPN.

5.6 Análise microscópica do filme sanguíneo

Além da investigação de parâmetros hematológicos e índices hematimétricos, os filmes sanguíneos dos pacientes dos três grupos de anemias microcíticas e hipocrômicas foram submetidos a uma minuciosa análise microscópica visando encontrar possíveis diferenças morfológicas que pudessem auxiliar na diferenciação entre estas. Foi avaliada a presença e a proporção de ovalócitos, dacriócitos, hemácias em alvo, hemácias com pontilhados basófilos, a formação de *rouleaux* e outras alterações morfológicas nos pacientes participantes do estudo. A maior proporção de dacriócitos foi encontrada na β talassemia menor onde 21 pacientes, um percentual de 91,3%, continham dacriócitos em seus filmes sanguíneos, enquanto apenas sete pacientes portadores de anemia ferropriva (8,4%) e sete pacientes do grupo ADC (13,2%) apresentavam estas formas eritrocitárias. De maneira semelhante, a maior proporção de hemácias em alvo foi observada no grupo β talassemia menor onde todos os pacientes mostravam tais formas; no grupo ADC este número foi de 27 pacientes (50,9%) e no grupo de pacientes portadores de anemia ferropriva, 30 pacientes correspondentes a 36,1%. A formação de *rouleaux* foi verificada em 18 pacientes (34%) do grupo ADC, quatro pacientes com β talassemia menor (17,4%) e cinco pacientes portadores de anemia ferropriva (6,0%), o que mostra uma proporção notavelmente maior desta alteração no grupo ADC. O número de pacientes apresentando ovalócitos em seus filmes sanguíneos foi elevado em todos os grupos. A única alteração presente apenas no grupo da β talassemia menor foram as hemácias com pontilhados basófilos. Neste grupo 14 pacientes (60,9%) mostravam tal alteração morfológica (Tabela 9).

Tabela 9 - Alterações morfológicas dos eritrócitos e número de pacientes com o respectivo valor percentual.

	AF (n=83)	ADC (n=53)	β -Tal (n=23)
Pontilhado basófilo	0	0	14 (60,9%)
Ovalócito	61 (73,5%)	43 (81,1%)	22 (95,6%)
Dacriócito	7 (8,4%)	7 (13,2%)	21 (91,3%)
Hemácia em alvo	30 (36,1%)	27 (50,9%)	23 (100,0%)
<i>Rouleaux</i>	5 (6,0%)	18 (34,0%)	04 (17,4%)

AF - anemia ferropriva, ADC - anemia de doença crônica, β -Tal - β talassemia menor.

6 DISCUSSÃO

6.1 Considerações gerais

Os principais distúrbios que cursam com microcitose são a anemia ferropriva, anemia de doença crônica e talassemias. A anemia ferropriva é a mais prevalente no mundo enquanto a β -talassemia menor é comum nos países do Mediterrâneo (YERMIAHU *et al.*, 1999) e descendentes desta região.

Na população abrangida por este trabalho foi possível verificar, comprovando os dados da literatura, a maior prevalência da anemia ferropriva (83 casos correspondentes a 34,0%) seguida pela anemia de doença crônica com 53 pacientes, em percentual de 21,7%. Por último, a β talassemia menor que totalizou 23 casos correspondendo a 9,4%. Os resultados obtidos apresentam um percentual bastante significativo para anemia de doença crônica, anemia multifatorial constituindo um distúrbio bastante comum em pacientes hospitalizados (WEISS, 2002; ROY *et al.*, 2003; JAYARANEE & STHANESHWAR, 2006), fato observado aqui pelo grande número de pacientes do grupo ADC (75,5%) que se encontravam internados, consonante com o fato destes terem sido recrutados em ambiente hospitalar. Este fato implica em uma menor frequência da anemia ferropriva quando comparada aos dados da literatura, enquanto o percentual observado para β talassemia menor reforça a idéia da necessidade de se apurar o diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas considerando as diferentes condutas médicas para cada caso. No grupo β talassemia menor, a maioria dos pacientes foi proveniente do ambulatório (78,3%) devido ao fato de que as talassemias na forma menor não implicam em maiores complicações, sendo desnecessária a internação do paciente exclusivamente por este distúrbio. Esta circunstância já havia sido observada por Srivastava & Bevington (1973) quando verificaram que os pacientes envolvidos em seu estudo portadores de α talassemia menor, β talassemia menor ou α - β talassemia foram atendidos em hospital por uma variedade de razões outras que não o distúrbio hematológico primário.

Outro achado que chama a atenção é a prevalência significativamente maior da anemia ferropriva entre mulheres (79,5%) em relação a homens (20,5%) provavelmente por serem as mulheres, dentre pessoas adultas, o grupo de maior risco, apresentando grande perda de ferro nos períodos menstruais, gravidez e lactação. A maior frequência

de anemia ferropriva em mulheres devido a perda menstrual e gravidez já foi relatada por Higgins & Rockey (2003). O mesmo não ocorreu para o grupo ADC que apresentou uma percentagem praticamente igual de homens (49,1%) e mulheres (50,9%) mostrando que tal patologia atinge pacientes hospitalizados de uma maneira geral. No grupo de pacientes portadores de β talassemia menor houve maior prevalência de mulheres. Contudo, em virtude da talassemia não ser uma doença genética ligada ao sexo, acreditamos que o motivo desta maior proporção de pacientes do sexo feminino seja unicamente devido ao fato de que usualmente são as mulheres que mais buscam o serviço de saúde para realização de *check-up* ou acompanhamento de doenças.

Por razões várias, o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas reveste-se de grande importância clínica. Contudo, este diagnóstico diferencial das anemias microcíticas é, muitas vezes, complexo e sua investigação laboratorial apresenta custos significativos. A análise microscópica do filme sanguíneo na realização de um hemograma, exame que apresenta baixo custo, não consegue discriminar entre tais anemias, uma vez que em considerável número de casos há uma grande semelhança morfológica das doenças. Desta forma, tornam-se necessários exames complementares ao hemograma. Atualmente, a comprovação diagnóstica da anemia ferropriva se faz pela avaliação do metabolismo do ferro, utilizando-se para isso dosagens laboratoriais que incluem ferro sérico, capacidade de ligação total do ferro sérico e, ainda, ferritina sérica. No caso da β talassemia menor há necessidade da realização de eletroforese de hemoglobina e dosagens de HbA₂ e HbF para o seu diagnóstico. Apesar de sua grande utilidade, estes exames denominados padrão-ouro no diagnóstico destas anemias microcíticas e hipocrômicas, possuem, algumas vezes, uma metodologia demorada, são mais onerosos e, não raras vezes, inacessíveis a uma população menos favorecida. Aos fatores de ordem financeira, somam-se os de ordem fisiopatológica. É bem conhecido que, embora ambas, talassemia menor e anemia ferropriva, apresentem no decorrer de seu desenvolvimento eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, tais doenças têm patogênese, tratamento e prognóstico inteiramente diferentes. Então, o diagnóstico correto torna-se clinicamente importante. Enquanto a anemia ferropriva é facilmente corrigida com a suplementação do ferro, tal tratamento deveria ser totalmente evitado na talassemia menor dado que alguns pacientes

talassêmicos apresentam maior absorção do ferro ou podem requerer transfusão sanguínea conforme necessidade do caso, levando gradativamente ao acúmulo do ferro, principal complicação encontrada no paciente portador de talassemia. Entretanto, o diagnóstico da β talassemia menor é, algumas vezes, negligenciado pelo clínico ao deparar com microcitose e níveis discretos de anemia; e, infelizmente o tratamento com suplementos férricos ainda é frequentemente prescrito numa vã tentativa de normalizar a microcitose (ELDIBANY *et al.*, 1999; OLIVIERI, 1999; YERMIAHU *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2002). Além disso, a ausência de um correto diagnóstico de uma hemoglobinopatia diminui a eficiência dos programas de aconselhamento genético necessários nestes casos para evitar possível ocorrência de homozigose nos descendentes. Além das considerações acima, o próprio tratamento com suplementos férricos envolve gastos adicionais devendo-se, também por mais este motivo, somente ser indicado na real necessidade deste.

Torna-se oportuno ressaltar que pacientes atendidos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), devido às restrições de ordem financeira e outras, são avaliados, em grande maioria das vezes, apenas por um hemograma, sendo a taxa de hemoglobina e os aspectos morfológicos relativos à série vermelha decisivos para o enquadramento do paciente como portador de anemia microcítica e hipocrômica. Em condições ideais, a suspeita inicialmente levantada pela hematoscopia deveria ser confirmada por exames específicos demandando tempo e recursos financeiros adicionais. Como tal prática não se aplica à realidade dos laboratórios clínicos da rede pública em nosso meio, os pacientes portadores de anemia microcítica e hipocrômica são, na maioria das vezes, tratados com suplementação férrica, desconsiderando as demais possíveis causas deste tipo de anemia. Desta maneira, o desenvolvimento de um método mais simples e e menos oneroso para *screening* das anemias microcíticas e hipocrômicas seria extremamente útil. A motivação e o objetivo para a análise conduzida no presente estudo surgiram face às limitações expostas acima que, indubitavelmente, dificultam o correto diagnóstico implicando em tratamentos errôneos e prejudiciais ao paciente.

6.2 Parâmetros do hemograma

Já vem sendo proposto, que vários parâmetros obtidos da análise de eritrócitos realizada nos modernos contadores eletrônicos e índices derivados de tais parâmetros, podem ser bastante valiosos para diferenciação das várias anemias microcíticas.

A partir dos resultados obtidos através da análise estatística, verificou-se que o parâmetro número de hemácias do hemograma poderia fazer a distinção dos três grupos entre si enquanto o VCM e a hemoglobina fariam a diferenciação de pelo menos dois grupos ao nível de 99% de confiança. O número de hemácias mostrou os menores valores no grupo ADC refletindo, provavelmente, a fisiopatologia do distúrbio na qual verifica-se uma inibição da proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides pela ação de citocinas pró-inflamatórias (MEANS, 2003). Os pacientes do grupo anemia ferropriva mostraram valores intermediários para o número de hemácias, sem maiores decréscimos. Isto se deve ao fato de que na anemia ferropriva a proliferação de progenitores eritróides não se encontra comprometida como na ADC. Realmente, o mecanismo desencadeador da anemia ferropriva se refere à restrição de ferro à medula óssea comprometendo de forma mais importante a síntese da hemoglobina e não a formação dos eritrócitos. Por outro lado, o maior número de eritrócitos foi observado na β talassemia menor. Este achado se encontra relacionado à fisiopatologia da β talassemia menor na qual a precipitação de cadeias α -globinicas nos precursores eritróides e eritrócitos circulantes resulta em uma discreta eritropoese ineficaz, aumento da eritropoetina e, finalmente, uma leve a moderada expansão da eritropoese pela medula óssea na tentativa de compensar a anemia. Este mecanismo se manifesta por um aumento no número de hemácias do sangue (HILLIARD & BERKOW, 1996; HANDIN *et al.*, 2003; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). A hiperplasia eritróide da medula óssea consegue elevar a contagem de eritrócitos muito acima da usual mas, na maioria das vezes, não consegue atingir um valor de hemoglobina normal; os micrócitos, mesmo em número excessivo, são insuficientes. É lícito fazer a suposição de que, se não houvesse certa eritropoese ineficaz e leve diminuição da sobrevivência eritróide pelo efeito deletério da precipitação do excesso de cadeias α , a eritrocitose seria ainda maior, e a anemia, totalmente compensada (FAILACE, 2003). De fato, o

número de hemácias é útil como um parâmetro diagnóstico adjunto pois as talassemias do tipo menor produzem uma anemia microcítica com um aumento associado de eritrócitos. Os pacientes com β talassemia menor apresentam maior número de hemácias para o grau de anemia quando comparados aos pacientes portadores de anemia ferropriva. Outras causas de anemia microcítica, tais como a ADC, estão tipicamente relacionadas com uma diminuição do número de hemácias proporcional ao grau do decréscimo da concentração de hemoglobina (HILLIARD & BERKOW, 1996; CLARKE & HIGGINS, 2000). Vários trabalhos investigaram a importância da contagem de eritrócitos na diferenciação das formas mais comuns de anemias microcíticas e hipocrômicas tais como o de Flynn *et al.* (1986) no qual uma eritrocitose (contagem de eritrócitos acima dos valores de referência segundo idade e sexo) foi comumente observada nos pacientes com talassemia menor e distintamente incomum nos pacientes portadores de anemia ferropriva. Melo *et al.* (2002) encontraram uma contagem de eritrócitos acima de cinco milhões como índice bastante útil para a triagem das referidas anemias e suspeita de β talassemia menor. Esta mesma cifra (superior a cinco milhões de hemácias) foi observada na maioria dos pacientes com β talassemia menor no trabalho de Madan *et al.* (1998). Demir *et al.* (2002), verificaram em seu estudo, que a contagem de eritrócitos é um dos índices de maior acurácia na distinção entre o traço talassêmico e a anemia ferropriva diagnosticando corretamente 90% dos pacientes.

O parâmetro hemoglobina permitiu a diferenciação da β talassemia menor dos demais grupos. Os maiores valores de hemoglobina foram encontrados no grupo β talassemia menor, o que pode ser explicado, de forma semelhante ao discutido para o número de hemácias, pelo mecanismo associado à β talassemia menor. Realmente, as talassemias menores produzem mínimos decréscimos na concentração de hemoglobina (CLARKE & HIGGINS, 2000). Yermiahu *et al.* (1999), de maneira semelhante ao observado neste trabalho, verificaram que os pacientes com β talassemia menor possuem uma leve anemia e contagens relativamente altas de eritrócitos enquanto os pacientes com anemia ferropriva apresentavam resultados mais baixos para a concentração de hemoglobina e número de hemácias se comparados aos pacientes β talassêmicos menores. No estudo destes pesquisadores os referidos parâmetros foram

significativamente mais altos em pacientes com traço β talassêmico comparados aos pacientes com anemia ferropriva.

O parâmetro VCM diferenciou apenas o grupo de pacientes com anemia de doença crônica dos demais grupos ao nível de significância de 1%. O VCM se mostra nitidamente maior na ADC, refletindo uma menor microcitose, ou seja, o comprometimento na síntese de hemoglobina é menor comparado às duas outras anemias estudadas. A diminuição na taxa total de hemoglobina no caso da ADC se deve prioritariamente à redução do número de hemácias e não à redução da síntese de hemoglobina dentro de cada glóbulo vermelho. Como é conhecido o aporte de ferro à medula óssea pode estar comprometido por ação de citocinas pró-inflamatórias resultando em discreta redução da síntese de hemoglobina, porém, esta redução parece não ser tão importante quanto na anemia ferropriva e β talassemia menor. Contudo, a diferenciação entre β talassemia menor e anemia ferropriva não se mostrou possível a 1%, somente sendo observada a 5%. Apesar de não diferenciar as duas condições, analisando de maneira conjunta os parâmetros número de hemácias, hemoglobina e VCM foi observado que o paciente talassêmico apresenta os maiores valores para número de hemácias e hemoglobina e os menores para VCM. Tal observação se encontra em conformidade com dados da literatura relatando que para um dado valor de volume corpuscular médio, o nível de hemoglobina e o número de eritrócitos tendem a ser mais altos na talassemia menor em comparação à anemia ferropriva (LAFFERTY *et al.*, 1996); ou seja, para um mesmo grau de anemia, os eritrócitos na talassemia menor são mais microcíticos do que na anemia ferropriva. Conseqüentemente, o volume corpuscular médio tende a ser menor e a contagem de hemácias maior em casos de talassemia menor (GREEN & KING, 1989; MELO *et al.*, 2002). Já Lafferty *et al.* (1996) verificaram a importância do volume corpuscular médio como o índice mais promissor para discriminar entre as microcitoses talassêmicas das não talassêmicas. De forma contrária ao presente estudo, Yermiahu *et al.* (1999) observaram que o VCM, ao nível de 1%, se mostrou significativamente menor em pacientes com traço β talassêmico comparados aos pacientes com anemia ferropriva.

A hemoglobina corpuscular média se mostrou significativamente maior na ADC se comparada à β talassemia menor e anemia ferropriva em virtude da fisiopatologia do

distúrbio onde a redução do número de eritrócitos parece ser o maior responsável pela diminuição da taxa de hemoglobina total do que a síntese de hemoglobina propriamente dita, levando a uma mínima diminuição da HCM.

Outro parâmetro sugerido para a distinção entre as condições que cursam com microcitose é o RDW. O RDW foi descrito primeiramente por Bessman & Feinstein (1979) e atualmente consta das análises dos contadores automáticos modernos. Tal índice reflete a heterogeneidade de distribuição do tamanho dos eritrócitos medindo o coeficiente de variação em torno do VCM (TRENT, 2006). Como verificado por Bessman & Feinstein (1979), os eritrócitos de pacientes com talassemia menor são mais homogêneos quando comparados aos dos pacientes com anemia ferropriva. Conseqüentemente, o RDW tende a ser maior na anemia ferropriva do que nas talassemias menores (TRENT, 2006). Na α e β talassemias tipo menor, quase todos os eritrócitos são microcíticos devido a uma síntese deficiente de cadeias globínicas resultante de mutações que são expressas igualmente em todos os precursores de hemácias tornando os valores de RDW relativamente constantes (ASLAN *et al.*, 2002). Uma microcitose homogênea também descrita por Bessman & Feinstein (1979) é observada nos pacientes com anemia de doença crônica na qual a presença de anisocitose e poiquilocitose são incomuns. O mesmo não ocorre na anemia ferropriva onde a anisocitose verificada é devido à coexistência, no sangue periférico, de células sanguíneas vermelhas produzidas na medula óssea durante estágios progressivos de deficiência do ferro, dando lugar a uma população variada de eritrócitos incluindo normocíticos e aqueles progressivamente microcíticos (GREEN & KING, 1989). O aporte intermitente de ferro à medula óssea, reflexo da progressiva redução das reservas de ferro do organismo e da ingesta desigual de ferro, em dias sucessivos, vem corroborar também para o aumento da anisocitose.

Contudo, existem controvérsias sobre a real eficácia do RDW como parâmetro auxiliar na distinção das anemias. Yermiahu *et al.* (1999) e Aslan *et al.* (2002) verificaram a existência de diferença estatisticamente significativa para o RDW entre os pacientes com anemia ferropriva e β talassemia menor. O mesmo não foi encontrado nos trabalhos de Flynn *et al.* (1986); Tillyer & Tillyer (1994) e Lafferty *et al.* (1996) que provaram ser o RDW um índice com pequeno poder discriminatório e contribuição

limitada na diferenciação dos estados microcíticos. Eldibany *et al.* (1999) encontraram valores aumentados de RDW em ambas, talassemia menor (dos tipos α e β) e anemia ferropriva. No estudo de Demir *et al.* (2002) foi observada uma pequena acurácia diagnóstica para o RDW, uma vez que este parâmetro classificou corretamente apenas 59% dos pacientes e apresentou um índice de Youden de 30, superior apenas ao Índice de Shine & Lal. Em trabalho mais recente investigando a diferenciação entre talassemia menor e anemia ferropriva, conduzido por Alfadhli *et al.* (2006), o RDW também não se mostrou bastante eficiente, obtendo o segundo menor índice de Youden (4,5) dentre as nove funções avaliadas. No Brasil, Lima *et al.* (1996) avaliando a utilidade clínica do RDW, verificaram que 90% dos pacientes com anemia ferropriva e 77% dos pacientes com β talassemia menor foram corretamente identificados usando valores de RDW superiores ou inferiores a 21%, respectivamente. Sob a ótica de tais resultados foi concluído que o RDW poderia ser um método específico e sensível para identificar a anemia ferropriva entre pacientes apresentando um quadro de microcitose; contudo, este parâmetro não seria um bom índice para a identificação da β talassemia menor. Desta forma, uma distinção clara entre estes distúrbios não poderia ser feita baseando-se no RDW apenas.

Neste estudo não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas para o RDW entre os três grupos de anemias microcíticas avaliadas, indicando não ser este índice um parâmetro auxiliar eficiente na diferenciação destas anemias.

É interessante observar que, embora apresentando microcitose e hipocromia, os pacientes com β talassemia menor nem sempre mostram um quadro de anemia. Este foi o caso de nove (9) pacientes do presente estudo que, portadores de β talassemia menor diagnosticada por eletroforese de hemoglobina e dosagem de HbA₂, apresentavam valores de hemoglobina dentro dos limites de referência para homens e mulheres não podendo ser classificados como anêmicos. Apesar deste fato já ter sido notado anteriormente por pesquisadores tais como Madan *et al.* (1998) (que em seu próprio trabalho separaram os pacientes com β talassemia menor em dois grupos a saber, os portadores de anemia e aqueles não portadores desta condição), cumpre chamar a atenção da equipe de laboratórios clínicos com referência à presença de β talassemia menor associada à diminuição do VCM e aumento do número de hemácias,

porém com dosagem de hemoglobina dentro dos limites normais. São casos que na rotina laboratorial muitas vezes são interpretados como uma contagem de hemácias errônea (que deveria ser menor se fosse baseada no hematócrito). No entanto, são casos reais que permitem ao laboratório sugerir o diagnóstico de β talassemia menor apenas pelos índices e número de hemácias; todos estes casos foram confirmados através da eletroforese de hemoglobina. Então, é possível que os casos de β talassemia menor sejam subestimados na população já que nem sempre a dosagem de hemoglobina é baixa, embora o VCM se apresente diminuído e o número de hemácias aumentado. O referido perfil do hemograma é altamente sugestivo de β talassemia menor.

6.3 Potencial aplicação de índices na discriminação de anemias microcíticas e hipocrômicas

Além dos parâmetros isolados obtidos dos modernos contadores automáticos, várias fórmulas que utilizam combinações das referidas medidas são utilizadas na tentativa de se abreviar custos e otimizar tempo e mão de obra no diagnóstico das anemias que cursam com microcitose e hipocromia.

Vários índices desenvolvidos com esse objetivo podem ser citados entre eles Índice de Green & King, Shine & Lal, Srivastava, Mentzer, Índice do RDW, dentre outros. Todos os índices citados, além do Novo Índice criado (NI), foram testados nos pacientes envolvidos neste trabalho determinando-se suas sensibilidades, especificidades, valores preditivos positivos, valores preditivos negativos, eficiência e calculadas suas áreas sob a curva ROC, com a finalidade de verificar sua utilidade, e também qual destes e, em que proporção, melhor distingue portadores de β talassemia menor e de anemia ferropriva.

Muitos estudos anteriores a este já foram realizados para verificação e comparação da eficácia no uso destas fórmulas (GREEN & KING, 1989; LAFFERTY *et al.*, 1996; DEMIR *et al.*, 2002; ALFADHLI *et al.*, 2006). Na população estudada neste trabalho, os resultados encontrados na aplicação de tais índices foram variados. Isoladamente o índice que apresentou melhor eficiência totalizando um percentual de

92,4% (o Índice de Green & King, considerando-se o valor de *cut-off* de 66,3 mostrou este mesmo valor de eficiência) e com maior valor de área sob a curva ROC (0,895) foi, para nossa satisfação, a nova fórmula desenvolvida neste estudo (NI). O maior valor do índice de Youden observado para o Novo Índice (NI) também confirmou a sua grande acurácia e validade diagnóstica na distinção entre β talassemia menor e anemia ferropriva.

O segundo índice com maior acurácia baseado principalmente nos parâmetros eficiência, área sob a curva ROC e índice de Youden foi o Índice de Green & King. Este índice mostrou 78,3 e 95,2% para sensibilidade e especificidade no diagnóstico da β talassemia menor, respectivamente. O índice de Youden obtido para o IGK apresentou um valor de 73,5. O estudo de Demir *et al.* (2002) que também testou vários índices dentre estes, o de Green & King, encontrou para esta função discriminante, uma sensibilidade de 97%, especificidade de 70% e um valor semelhante ao encontrado no presente trabalho (67) para o índice de Youden. No resultado global, a fórmula desenvolvida por Green & King foi a terceira melhor para a discriminação entre β talassemia menor e anemia ferropriva. Melo *et al.* (2002) encontrou 76,4 e 85,7 % para a sensibilidade e especificidade do Índice de Green & King. Já o resultado encontrado por Liu *et al.* (1997) foi de que a fórmula de Green & King se mostrou a melhor função discriminante dentre aquelas testadas. Eldibany *et al.* (1999) também encontraram um boa sensibilidade para o Índice de Green & King, a saber 90,3% e concluíram ser um bom discriminante. No trabalho original de Green & King (1989) a fórmula estabelecida por estes autores identificou corretamente 100% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 100% dos pacientes portadores de β talassemia menor. Um resultado semelhante ao de Green & King (1989) foi encontrado por Lima *et al.* (1996) no qual o Índice de Green & King corretamente identificou 97% dos pacientes com anemia ferropriva e o mesmo percentual de β talassêmicos menores, porém usando um valor de *cut-off* de 80. Estes autores concluíram, então, que a função discriminante de Green & King poderia ser útil no *screening* inicial visando a diferenciação entre anemia ferropriva e β talassemia menor. Em trabalho mais recente envolvendo a avaliação de índices discriminantes feito por Alfadhli *et al.* (2006), foi observado, ao contrário dos outros estudos já citados, que a fórmula de Green & King esteve entre as três fórmulas

com menor desempenho na separação de tais doenças, mostrando um índice de Youden de 47,6.

O Índice do RDW foi, como um todo, o terceiro índice com melhor desempenho, apresentando uma eficiência de 83%, área sob a curva ROC de 0,852 e índice de Youden de 65,7. Este índice obteve ainda 82,6% e 83,1% de sensibilidade e especificidade respectivamente, no diagnóstico da β talassemia menor. O estudo conduzido por Jayabose *et al.* (1999) onde o Índice do RDW foi criado, envolveu 102 pacientes, 46 destes portadores de anemia ferropriva e 56 de talassemia menor e mostrou sensibilidade e especificidade de 92,8% para tal fórmula no diagnóstico da talassemia menor. Já no estudo de Demir *et al.* (2002) foi encontrado um resultado de 100% de sensibilidade, 80% de especificidade e índice de Youden de 80, sendo este índice considerado por tais pesquisadores, a segunda melhor fórmula testada. Alfadhli *et al.* (2006) encontraram ao investigar esta mesma fórmula, valores de 65,9% para sensibilidade, 83,9% de especificidade e índice de Youden de 49,8 e, no geral, o Índice do RDW ocupou o sexto lugar como melhor função discriminante.

Outro índice testado, denominado Índice de Mentzer, foi considerado o quarto melhor discriminante entre β talassemia menor e anemia ferropriva apresentando mesma eficiência do Índice de RDW (83%), sensibilidade de 69,6%, especificidade de 86,7%, área sob a curva de 0,835 e índice de Youden de 56,3. No trabalho realizado por England & Fraser (1979) onde foram testadas somente três fórmulas discriminantes, os resultados indicaram que o Índice de Mentzer obteve o segundo melhor resultado na diferenciação dos casos de microcitose, identificando corretamente 87,4% dos pacientes. Green & King (1989) encontraram na amostra empregada para testar o índice de sua autoria, que o Índice de Mentzer corretamente diagnosticou 82% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 94% dos β talassêmicos menores. Para Lafferty *et al.* (1996), o Índice de Mentzer juntamente com outras duas funções foram os melhores discriminantes, mostrando as maiores áreas sob a curva ROC. Outro trabalho testando a fórmula de Mentzer foi o Jayabose *et al.* (1999) que encontraram um valor de sensibilidade 87,5% e especificidade 81,6% para o diagnóstico da talassemia menor. Na amostra usada para o trabalho de Eldibany *et al.* (1999), o Índice de Mentzer apresentou uma sensibilidade de 70,6%, a terceira maior sensibilidade entre os cinco

discriminantes testados para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor. Já os valores encontrados para sensibilidade e especificidade da fórmula de Mentzer no trabalho de Demir *et al.* (2002) foram 86% e 62% respectivamente para o diagnóstico da β talassemia menor; e, ainda, um índice de Youden de 48. O estudo mais recente abordando a utilização dos índices na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor conduzido por Alfadhli *et al.* (2006), colocou o Índice de Mentzer como o terceiro melhor discriminante baseado no índice de Youden, valor este de 60,1, semelhante ao encontrado no presente estudo. Estes autores encontraram para a referida fórmula sensibilidade de 74,4% e especificidade de 85,7% no diagnóstico da β talassemia menor.

O Índice de Srivastava, também aplicado aos pacientes envolvidos neste trabalho, apresentou o segundo menor valor para o parâmetro eficiência, 69,8%; índice de Youden, 42,6 e área sob a curva ROC, 0,775. Este índice mostrou ainda sensibilidade (73,9%) e especificidade (68,7%) pequenas, comparadas aos índices discutidos anteriormente no diagnóstico da β talassemia menor. Poucos foram os trabalhos da literatura que testaram a fórmula de Srivastava, entre estes o de Green & King (1989) onde 79% dos pacientes com anemia ferropriva e 91% dos pacientes β talassêmicos menores foram corretamente diagnosticados por esta. Demir *et al.* (2002) encontraram, para o discriminante de Srivastava, baixos valores para sensibilidade e especificidade para β talassemia menor, a saber 60% e 77%, respectivamente. Tal índice apresentou também um baixo índice de Youden (37), valor próximo ao encontrado no presente estudo; sendo que tais resultados fizeram com que este índice mostrasse um dos piores desempenhos entre os oito discriminantes testados por estes pesquisadores. O último trabalho testando o Índice de Srivastava foi o de Alfadhli *et al.* (2006) onde foi encontrado um valor de sensibilidade de 85% e 69,6% de especificidade para β talassemia menor e, um índice de Youden de 54,9. Os resultados destes parâmetros levaram a classificar o Índice de Srivastava por tais pesquisadores como quarto melhor discriminante entre anemia ferropriva e β talassemia menor, de maneira contrária ao encontrado por Demir *et al.* (2002) e pelo presente trabalho.

O último índice testado neste estudo foi a fórmula desenvolvida por Shine & Lal, que se mostrou o discriminante com pior desempenho na distinção entre anemia

ferropriva e β talassemia menor. O índice em questão apresentou uma sensibilidade de 100% para β talassemia menor classificando corretamente todos os 23 pacientes deste grupo; contudo, sua especificidade foi apenas 4,8%, diagnosticando corretamente somente quatro pacientes do grupo anemia ferropriva. Os demais 79 pacientes do referido grupo foram classificados erroneamente como portadores de β talassemia menor. A eficiência calculada para esta fórmula foi de 25,5% refletindo a baixa acurácia do discriminante. O índice de Youden também mostrou o menor valor (4,8) para tal função discriminante sugerindo que esta fórmula apresenta a menor validade diagnóstica para diferenciar corretamente β talassemia menor de anemia ferropriva. Os resultados encontrados estão de acordo com os recentes achados de Alfadhli *et al.* (2006) que encontraram um valor de sensibilidade de 97,8% e especificidade de 1,7% no diagnóstico da β talassemia menor e, ainda, um índice de Youden extremamente baixo de 0,5. Os achados levaram a classificar o Índice de Shine & Lal como a fórmula menos eficiente na discriminação entre as oito fórmulas testadas, de maneira semelhante ao presente estudo. Demir *et al.* (2002) encontraram resultados semelhantes aos deste estudo e daquele conduzido por Alfadhli *et al.* (2006). Os referidos pesquisadores encontraram sensibilidade de 100%, especificidade de zero e um índice de Youden também com valor zero para o Índice de Shine & Lal. Como já citado anteriormente, um índice de Youden com valor próximo a zero sugere que o método utilizado não é melhor que qualquer técnica usada ao acaso. Os pesquisadores Green & King (1989) já haviam encontrado baixo desempenho da fórmula criada por Shine & Lal, tendo este índice diagnosticado corretamente somente 11% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 100% dos pacientes com β talassemia menor. Podem ser citados ainda os trabalhos de England & Fraser (1979) e o de Lafferty *et al.* (1996). England & Fraser (1979) verificaram também que o Índice de Shine & Lal diagnosticou corretamente 100% dos pacientes portadores de β talassemia menor, porém 100% dos pacientes com anemia ferropriva foram erroneamente classificados como β talassêmicos menores. Lafferty *et al.* (1996) foi o único trabalho no qual se verificou um bom desempenho da fórmula de Shine & Lal sendo juntamente com o parâmetro VCM e Índice de Mentzer, os discriminantes que apresentavam as melhores

curvas ROC. Pelo exposto, o Índice de Shine & Lal não se mostra uma fórmula eficiente na diferenciação da β talassemia menor de outras anemias microcíticas.

Mesmo testando-se um valor de *cut-off* de 66,3, ligeiramente superior ao encontrado para o Índice de Green & King no trabalho original dos referidos autores, o Novo Índice (NI) apresentou maiores resultados para área sob a curva ROC, índice de Youden, sensibilidade e VPN confirmando sua melhor acurácia diagnóstica.

A comparação do desempenho dos índices nos vários trabalhos envolvendo sua análise mostra resultados variáveis nas diferentes populações testadas o que já havia sido percebido por Liu *et al.* (1997).

O que mais chamou a atenção foi o fato de que mesmo aplicando-se seis índices aos pacientes com anemia ferropriva deste trabalho, nenhum destes conseguiu diagnosticar corretamente um (1) dos pacientes pertencentes ao referido grupo. Todos os índices mostraram valores condizentes com o diagnóstico de talassemia menor para o referido paciente sendo que este apresentava anemia ferropriva comprovada pelos exames padrão-ouro. O fato de nenhum dos índices permitir a separação confiável das anemias microcíticas e hipocrômicas já havia sido percebido por Melo *et al.* (2002) ao testar cinco índices hematimétricos. Tais pesquisadores buscaram, então, a capacidade de cada índice em melhor separar os grupos de anemias microcíticas por eles avaliados. Lafferty *et al.* (1996) verificaram que mesmo o parâmetro VCM com valor de *cut-off* de 72 fL, considerado pelo trabalho o mais vantajoso na diferenciação entre os estados causadores de microcitose, não apresentava uma acurácia de 100%. Também Demir *et al.* (2002) verificaram que nenhuma das funções discriminantes por eles testadas mostraram sensibilidade e especificidade de 100%.

Um dos motivos pelos quais não se obtêm resultados totalmente fidedignos na aplicação das inúmeras fórmulas desenvolvidas com a finalidade de discriminar as causas de anemia microcítica e hipocrômica é, certamente, a concomitância de doenças que ocorre em muitos pacientes. Mentzer (1973) ao testar sua fórmula e o Índice de England & Fraser verificou que os pacientes portadores de talassemia menor foram erroneamente classificados como deficientes em ferro quando outras causas de anemia estavam presentes tais como hemólise, hemorragia ou gravidez. Este pesquisador verificou ainda que, em geral, doenças coexistentes que influenciam a

contagem de eritrócitos tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica caracterizada por policitemia, invalidam os Índices de England & Fraser e o seu próprio índice como parâmetros diagnósticos para anemia ferropriva e talassemia menor. Green & King (1989) também observaram que ao aplicar a função discriminante elaborada pelos mesmos em pacientes onde coexistiam anemia ferropriva e talassemia menor, esta indicava anemia ferropriva.

A aplicação dos índices nos pacientes do grupo anemia de doença crônica mostrou uma sobreposição deste grupo com o grupo anemia ferropriva, o que veio confirmar a afirmação de Green & King (1989) de que a utilidade de sua função discriminante bem como de outras fórmulas criadas com a mesma finalidade se restringe à diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor, não se estendendo a outras causas de microcitose ou eritrocitose. Assim, tais funções não seriam de grande valor na distinção da anemia de doença crônica e da anemia ferropriva.

O uso dos índices não substitui os exames “padrão-ouro” no diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas. No entanto, cabe salientar que em determinadas condições de concomitância de doenças (por exemplo, anemia ferropriva e anemia de doença crônica), até mesmo os resultados dos exames padrão-ouro podem sofrer interferência da doença intercorrente, dificultando o diagnóstico. É bem conhecido que o diagnóstico da anemia ferropriva é particularmente alterado em pacientes com condições inflamatórias agudas ou crônicas porque a maioria dos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro são afetados pela reação de fase aguda (BRUGNARA, 2003). A interferência nos exames padrão-ouro de uma doença concomitante pode ser exemplificada pelo aumento da ferritina em pacientes com anemia de doença crônica o que poderia vir a mascarar uma anemia ferropriva em desenvolvimento; ou, também, a possível diminuição dos níveis de HbA₂ em um paciente portador de β talassemia menor quando este apresenta simultaneamente a anemia ferropriva (EL-AGOUZA *et al.*, 2002; WEISS, 2002). A possibilidade de redução dos níveis de HbA₂ devido à anemia ferropriva levou Madan *et al.* (1998) a sugerir que para cada grupo populacional seria necessário avaliar a utilidade da dosagem de HbA₂

como um teste confirmatório para a presença de β talassemia menor concomitantemente à anemia ferropriva.

Então, embora não seja possível alcançar um diagnóstico definitivo de anemia ferropriva ou talassemia menor baseando-se meramente nas funções discriminantes, estes simples cálculos podem ser potencialmente úteis no *screening* de pacientes com anemias microcíticas. O uso rotineiro de tais fórmulas poderia oferecer um direcionamento para a escolha de testes laboratoriais confirmatórios com custos mais altos quando assim fosse necessário e evitar um tratamento inapropriado, resultando assim em significativa redução de gastos pelo sistema de saúde.

6.4 Plaquetas e índices plaquetários

Apesar dos numerosos trabalhos sobre os índices eritrocitários na diferenciação dos estados que cursam com microcitose, existem poucos relatos sobre a eficiência dos índices plaquetários para tal finalidade. Apenas um estudo realizado por Timuragaoglu *et al.* (2004), investigou possíveis alterações nos parâmetros plaquetários objetivando a diferenciação entre duas anemias microcíticas e hipocrômicas, a saber: anemia ferropriva e β talassemia menor. Os referidos pesquisadores verificaram haver diferença estatisticamente significativa de todos os parâmetros plaquetários (número de plaquetas, VPM e PDW) quando o grupo anemia ferropriva e β talassemia menor foram comparados; observação esta, que os levaram à conclusão de que tais parâmetros poderiam ser usados na distinção das referidas anemias.

Neste trabalho, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os três grupos de anemias microcíticas e hipocrômicas em relação ao número de plaquetas ao nível de significância de 1% tomado por base na análise estatística. Este dado não se encontra em concordância com a literatura que relata, em vários trabalhos, ocorrer um fenômeno de trombocitose reativa em várias condições clínicas e cirúrgicas incluindo a anemia ferropriva, infecções, cirurgias, doenças inflamatórias, malignidades, hemólise ou sangramento agudo, recuperação de uma trombocitopenia, após esplenectomia e na artrite reumatóide (GILES, 1981; DAN, 2005).

É relatado que em casos de trombocitose observados comumente em processos infecciosos e inflamatórios e também na anemia ferropriva, um grande número de plaquetas com pequeno volume é liberado na circulação (GILES, 1981). Como já citado, na doença inflamatória intestinal em atividade foi observada uma diminuição do VPM e, de forma contrária, um aumento deste na IRC tratada com eritropoetina recombinante humana (SHARPE *et al.*, 1994; KAPSORITAKIS *et al.*, 2001). Contudo, a análise estatística deste trabalho mostrou não haver diferença estatisticamente significativa para o parâmetro volume plaquetário médio entre anemia ferropriva, β talassemia menor e anemia de doença crônica. Este parâmetro e também o número de plaquetas apresentaram uma grande dispersão de seus valores na ADC. Talvez este fato se deva à miscelânea de fatores que ocorrem na ADC, própria das doenças inflamatórias/infecciosas, renal, etc, que poderiam comprometer em graus diferentes e produzindo efeitos também distintos segundo o tipo de doença bem como a evolução da mesma. Tal suposição é sustentada pela grande variedade de doenças encontradas nos pacientes deste estudo que levaram ao quadro de ADC. Podem ser citadas dentre estas, a insuficiência renal crônica, doença cardíaca e neoplasias em tratamento quimioterápico.

Para o parâmetro PDW, foi verificado um valor estatisticamente maior na anemia de doença crônica se comparado aos demais grupos. Sabe-se, até o presente momento, que vários fatores hematopoéticos de crescimento tais como IL-1, IL-3, IL-6, IL-11, EPO e TNF presentes na anemia da doença crônica podem de maneira direta ou indireta, estimular a megacariocitopoese, promovendo a proliferação e maturação de megacariócitos que subseqüentemente aumentam de tamanho, número e ploidia (ISHIBASHI *et al.*, 1987; CARRINGTON *et al.*, 1991; HILL *et al.*, 1991; TERAMURA *et al.*, 1992; DAN *et al.*, 1995; KAUSHANSKY, 1998).

Analisando os resultados encontrados, observa-se que dentre os parâmetros plaquetários, apenas o PDW se mostrou um parâmetro auxiliar no diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas contribuindo para a distinção do grupo ADC dos demais grupos investigados.

6.5 Análise de filme sanguíneo: aspectos morfológicos

É bem conhecido ser frequentemente impossível diferenciar anemia ferropriva e β talassemia heterozigota unicamente através da morfologia eritrocitária sendo necessários exames diagnósticos complementares para esclarecer a etiologia da anemia (ENGLAND & FRASER, 1973). A análise dos filmes sanguíneos dos pacientes integrantes deste trabalho revelou que a microscopia pode fornecer importantes indícios na elucidação da patogênese relacionada à microcitose, embora não consiga, se utilizada de forma isolada, confirmar a presença de uma determinada anemia microcítica e hipocrômica. A presença de algumas alterações morfológicas eritrocitárias como hemácias com pontilhados basófilos, presentes no filme sanguíneo de 14 pacientes portadores de β talassemia menor e ausente em todos os pacientes dos grupos anemia ferropriva e anemia de doença crônica, fornece, assim, uma forte evidência da presença da doença em questão, apesar de Cavaliere (2004) ter relatado a possível ocorrência de pontilhados basófilos também na anemia ferropriva. Por outro lado, outras alterações avaliadas tais como presença de ovalócitos, dacriócitos, hemácias em alvo e formação de *rouleaux* se mostraram presentes em todos os três grupos e foram conseqüentemente consideradas de menor relevância para a diferenciação entre as anemias microcíticas e hipocrômicas estudadas. Porém, apesar de presentes em todos os grupos, as alterações citadas ocorreram em frequências variadas entre estes. A formação de *rouleaux* foi encontrada em maior proporção no grupo anemia de doença crônica refletindo, possivelmente, a fisiopatologia causadora do distúrbio que pode levar ao aumento de proteínas plasmáticas de fase aguda tais como o fibrinogênio e imunoglobulinas, como já citado anteriormente. O achado de dacriócitos e hemácias em alvo foi notavelmente maior em pacientes portadores de β talassemia menor se comparados aos grupos anemia ferropriva e anemia de doença crônica, informação esta que no contexto global da avaliação clínica de um determinado paciente apresentando microcitose, pode se mostrar como mais um indício esclarecedor da etiologia da doença envolvida. Cabe ressaltar que, apesar do grande cuidado na realização da análise microscópica, esta pode ter sido prejudicada devido ao fato de que a confecção do filme sanguíneo foi realizada após a exposição do

sangue ao anticoagulante EDTA, embora no prazo máximo de quatro horas após a coleta. A literatura e a própria experiência prática mostram que mesmo dentro deste período, a exposição do sangue ao EDTA pode provocar alterações incluindo-se a não visualização de pontilhados basófilos, aparecimento de hemácias crenadas e vacuolização de leucócitos (FAILACE, 2003). Contudo, em virtude da grande demanda de pacientes atendidos pelo hospital do IPSEMG e ao próprio contador automático, que realiza com extrema eficiência a análise do sangue dispensando a confecção de filmes sanguíneos de indivíduos normais, não foi possível contornar tal situação. Flynn *et al.* (1986) investigaram, em seu estudo sobre as limitações do RDW na avaliação de microcitoses, a presença de hemácias em alvo nos filmes sanguíneos dos pacientes participantes do estudo e verificaram que estas se encontravam presentes em 29 dos 97 pacientes com talassemia, representando um percentual de 30% do grupo e em 12 dos 68 pacientes portadores de anemia ferropriva. Finalmente, estes autores observaram que apenas 49 pacientes (27%) de sua amostra portadora de microcitose com as mais variadas causas, incluindo a anemia ferropriva, talassemia, outras hemoglobinopatias, doenças crônicas e distúrbios com concomitância de outros, exibiam hemácias em alvo em seus filmes sanguíneos. Apesar de comumente observadas nos casos de talassemia, a sensibilidade e a especificidade da presença de hemácias em alvo foram baixas em discriminar entre talassemia e outras patologias causadoras de microcitose, valores estes de 30% e 77%, respectivamente.

Uma última consideração, aparentemente paradoxal, é que apesar de não terem sido verificadas diferenças estatisticamente significativas para o RDW entre os três grupos de anemias, existe, à análise microscópica, uma tendência de maior anisocitose eritrocitária nos filmes sanguíneos dos pacientes portadores de anemia ferropriva se comparados aos demais grupos.

6.6 Limitações do estudo

O presente estudo apresentou algumas limitações de ordem técnica que possivelmente impossibilitaram o verdadeiro diagnóstico de alguns pacientes, fato este que os levou a serem enquadrados “erroneamente” no grupo dos não classificados ou mesmo serem excluídos do estudo. Neste contexto, citam-se possíveis casos de α

talassemia menor que poderiam ter passado despercebidos ao exame de eletroforese de hemoglobina uma vez que HbH e Hb Bart's são hemoglobinas instáveis e de migração rápida na eletroforese permanecendo, não raras vezes, indetectadas (COHEN *et al.*, 2004). De fato, as formas heterozigóticas de α talassemia com uma ou duas deleções somente podem ser confirmadas com certeza por métodos de biologia molecular ou por análise da síntese de cadeias globínicas mostrando um aumento da relação entre cadeias beta e cadeias alfa (HILLIARD & BERKOW, 1996; OLIVEIRA & NETO, 2004; ZAGO *et al.*, 2005) cuja realização foge ao escopo deste trabalho. Outro teste diagnóstico recomendado na detecção da α talassemia é a pesquisa de HbH. Contudo, esta pesquisa deve ser realizada tão logo o sangue seja colhido, o que não foi viável pela disponibilidade de retirar o sangue do laboratório do IPSEMG apenas no dia seguinte a sua coleta, após a liberação dos resultados do paciente. Este pode ter sido o caso de dois pacientes do grupo dos não classificados e um paciente portador de ADC para os quais todos os índices aplicados e também a constante K mostraram resultados compatíveis com talassemia menor.

Uma segunda limitação se refere à não realização da contagem de reticulócitos, tida como um dos objetivos iniciais deste estudo e, posteriormente, excluída devido também à impossibilidade de sua realização em tempo hábil. A contagem de reticulócitos poderia ser um indicativo de prováveis casos de α talassemia menor sem diagnóstico e uma evidência adicional de β talassemia menor, uma vez que as outras anemias investigadas neste trabalho não cursam com reticulocitose.

Finalmente, outra limitação já citada, se referiu à confecção do filme sanguíneo a partir do sangue em EDTA que, apesar de ter sido realizada dentro de quatro horas após a coleta, poderia ter prejudicado a análise microscópica principalmente quanto ao achado de pontilhados basófilos, dado bastante promissor como indício de diagnóstico de talassemia.

6.7 Perspectivas futuras de novos estudos

Entre as perspectivas futuras podem ser citadas:

- A aplicação e verificação do desempenho do índice criado neste estudo em nova população de pacientes portadores de β talassemia menor, incluindo um número bem maior de pacientes inclusive, se possível, aqueles casos com α talassemia menor. Em adição, a expressiva frequência de β talassemia menor encontrada em nosso meio vem motivar estudos adicionais para a utilização de novos métodos que permitam sua diferenciação da anemia ferropriva;

- Estudo genético empregando o método da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) para investigar quais as principais mutações presentes nos pacientes portadores de talassemia menor desta região do Brasil e as proporções em que ocorrem.

Partindo das perspectivas acima, um novo projeto de pesquisa será delineado com vistas ao Doutorado em futuro próximo.

7 CONCLUSÕES

- O grupo de pacientes avaliado se caracterizou pela maior prevalência da anemia ferropriva entre as anemias microcíticas e hipocrômicas estudadas, e um percentual significativo de anemia de doença crônica;
- O número de hemácias se mostrou o parâmetro mais eficiente na diferenciação das três anemias microcíticas e hipocrômicas, enquanto o RDW não se mostrou um bom discriminante;
- O índice plaquetário PDW pode ser um parâmetro auxiliar no diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas;
- O Novo Índice (NI) apresentou grande acurácia na discriminação entre β talassemia menor e anemia ferropriva, mostrando os maiores valores de área sob a curva ROC comparados aos outros índices testados;
- Alguns índices citados na literatura, desenvolvidos com a finalidade de diferenciar talassemia menor e anemia ferropriva, não proporcionaram um diagnóstico definitivo para os pacientes portadores de tais doenças; contudo, podem ser potencialmente úteis no *screening* de pacientes com anemias microcíticas;
- Os exames padrão-ouro no diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas não podem ser substituídos pelos índices discriminativos, porém, em casos de concomitância de doenças também apresentam limitações, sendo necessária a inclusão de exames adicionais;
- Com relação às alterações morfológicas dos eritrócitos, o pontilhado basófilo foi um achado bastante comum apenas em pacientes portadores de β talassemia menor.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHLUWALIA, N. Diagnostic utility of serum transferrin receptors measurement in assessing iron status. **Nutrition Reviews**, v. 56, p. 133– 141, 1998.

AHMED, Y.; IDDEKINGE, B. V.; PAUL, C.; SULLIVAN, H. F.; ELDER, M. G. Retrospective analysis of platelet numbers and volumes in normal pregnancy and pre-eclampsia. **British Journal of Obstetrics and Gynaecology**, v. 100, n. 3, p. 216-220, 1993.

AKAN, H.; GUVEN, N.; AYDOGDU, I.; ARAT, M.; BEKSAÇ, M.; DALVA, K. Thrombopoietic cytokines in patients with iron deficiency anemia with or without thrombocytosis. **Acta Haematologica**, v. 103, n. 3, p. 152-156, 2000.

ALFADHLI, S. M.; AL-AWADHI, A. M.; ALKHALDI, D. Validity assessment of nine discriminant functions used for the differentiation between iron deficiency anemia and thalassemia minor. **Journal of Tropical Pediatrics**, p. 1-5, december, 2006.

ALTER, B. P. The G_{γ} : A_{γ} composition of fetal hemoglobin in fetuses and newborns. **Blood**, v. 54, n. 5, p. 1158-1163, 1979.

ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M. Recent advances in intestinal iron transport. **Current Gastroenterology Reports**, v. 7, n. 5, p. 365-372, 2005.

ANDREWS, N. C. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1251-1253, 2004.

ANDREWS, N. C. Molecular control of iron metabolism. **Best Practice & Research. Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 159-169, 2005.

ANDREWS, N. C. The iron transporter DMT-1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 10, p. 991-994, 1999.

ANGASTINIOTIS, M.; MODELL, B. Global epidemiology of hemoglobin disorders. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 850, p. 251-269, 1998.

ASLAN, D.; GUMRUK, F.; GURGEY, A.; ALTAY, C. Importance of RDW value in differential diagnosis of hypochrome anemias. **American Journal of Hematology**, v. 69, n. 1, p. 31-33, 2002.

ATWEH, G. F.; LOUKOPOULOS, D. Pharmacological induction of fetal hemoglobin in sickle cell disease and beta-thalassemia. **Seminars in Hematology**, v. 38, n. 4, p. 367-373, 2001.

BATH, P. M.; BUTTERWORTH, R. J. Platelet size: measurement, physiology and vascular disease. **Blood Coagulation & Fibrinolysis : an International Journal in Haemostasis and Thrombosis**, v. 7, n. 2, p. 157-161, 1996.

BAYNES, R. D.; SHIH, Y. J.; COOK, J. D. Mechanism of production of the serum transferrin receptor. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 356, p. 61–68, 1994.

BEARD, J. L.; DAWSON, H.; PINERO, D. J. Iron metabolism: a comprehensive review. **Nutrition Reviews**, v. 54, n. 10, p. 295-317, 1996.

BEGUIN, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. **Clinica Chimica Acta**, v. 329, n. 1-2, p. 9-22, 2003.

BESSMAN, J. D.; FEINSTEIN, D. I. Quantitative anisocytosis as a discriminant between iron deficiency and thalassemia minor. **Blood**, v. 53, p. 288-293, 1979.

BILIC, E.; BILIC, E. Amino acid sequence homology of thrombopoietin and erythropoietin may explain thrombocytosis in children with iron deficiency anemia. **Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, n. 8, p. 675-676, 2003.

BOELAERT, J. R.; WEINBERG, G. A.; WEINBERG, E. D. Altered iron metabolism in HIV infection: mechanisms, possible consequences and proposals for management. **Infectious Agents and Disease**, v. 5, n. 1, p. 36-46, 1996.

BREYMAN, C. Iron deficiency and anaemia in pregnancy: modern aspects of diagnosis and therapy. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 29, n. 3, p. 506-516, 2002.

BROUDY, V. C.; LIN, N. L.; SABATH, D. F.; PAPAYANNOPOULOU, T.; KAUSHANSKY, K. Human platelets display high affinity receptors for thrombopoietin. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 1896-1904, 1997.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clinical Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 1573-1578, 2003.

BYRD, T. F.; HORWITZ, M. A. Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear phagocytes. Coordinate upregulation by iron transferrin and downregulation by interferon gamma. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, n. 3, p. 969–976, 1993.

CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C. S. Anemia de doença crônica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, n. 2, p. 127-136, 2002.

CARLEY, A. Anemia: When it is not iron deficiency? **Pediatric Nursing**, v. 29, n. 3, p. 205-211, 2003.

CARRINGTON, P. A.; HILL, R. J.; STENBERG, P. E.; LEVIN, J.; CORASH, L.; SCHREURS, J.; BAKER, G.; LEVIN, F. C. Multiple in vivo effects of interleukin-6 on murine megakaryocytopoiesis. **Blood**, v. 77, n. 1, p. 34-41, 1991.

CARTWRIGHT, G. E.; WINTROBE, M. M. Anemia of infection. A review. **Advances in Internal Medicine**, v. 5, p. 165-226, 1952.

CAVALIERE, T. A. Red blood cell indices: implications for practice. **Newborn and Infant Nursing Reviews**, v. 4, n. 4, p. 231-239, 2004.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clinical Chemistry**, v. 46, n. 8, p. 1284-1290, 2000.

COHEN, A. R. New advances in iron chelation therapy. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 42-47, 2006.

COHEN, A. R.; GALANELLO, R.; PENNELL, D. J.; CUNNINGHAM, M. J.; VICHINSKY, E. Thalassemia. **Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, p. 14-34, 2004.

COOK, J. D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 319-332, 2005.

COOK, J. D.; FLOWERS, C. H.; SKIKNE, B. S. The quantitative assessment of body iron. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3359-3364, 2003.

COOK, J. D.; SKIKNE, B. S.; BAYNES, R. D. Serum transferrin receptor. **Annual Review of Medicine**, v. 44, p. 63-74, 1993.

COUTINHO, G. G. P. L.; GOLONI-BERTOLLO, E. M.; BERTELLI, E. C. P. Iron deficiency anemia in children: a challenge for public health and for society. **São Paulo Medical Journal**, v. 123, n. 2, p. 88-92, 2005.

COYER, S. M. Anemia: diagnosis and management. **Journal of Pediatric Health Care**, v. 19, n. 6, p. 380-385, 2005.

DALLALIO, G.; LAW, E.; MEANS, R. T. J. Hepcidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2702-2704, 2006.

DAN, K. Thrombocytosis in iron deficiency anemia. **Internal Medicine (Tokyo, Japan)**, v. 44, n. 10, p. 1025-1026, 2005.

DAN, K.; GOMI, S.; INOKUCHI, K.; OGATA, K.; YAMADA, T.; OHKI, I.; HASEGAWA, S.; NOMURA, T. Effects of interleukin-1 and tumor necrosis factor on megakaryocytopoiesis: mechanism of reactive thrombocytosis. **Acta Haematologica**, v. 93, n. 2-4, p. 67-72, 1995.

DELABY, C.; PILARD, N.; HETET, G.; DRISS, F.; GRANDCHAMP, B.; BEAUMONT, C.; CANONNE-HERGAUX, F. A physiological model to study iron recycling in macrophages. **Experimental Cell Research**, v. 310, n. 1, p. 43-53, 2005.

DEMIR, A.; YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Most reliable indices in differentiation between thalassemia trait and iron deficiency anemia. **Pediatrics International: official journal of the Japan Pediatric Society**, v. 44, n. 6, p. 612-616, 2002.

DEMIR, A.; YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Serum transferrin receptor levels in beta-thalassemia trait. **Journal of Tropical Pediatrics**, v. 50, n. 6, p. 369-371, 2004.

DESSYPRIS, E. N.; GLEATON, J. H.; ARMSTRONG, O. L. Effect of human recombinant erythropoietin on human marrow megakaryocyte colony formation in vitro. **British Journal of Haematology**, v. 65, n. 3, p. 265-269, 1987.

DONOVAN, A.; BROWNLIE, A.; ZHOU, Y.; SHEPARD, J.; PRATT, S. J.; MOYNIHAN, J.; PAW, B. H.; DREJER, A.; BARUT, B.; ZAPATA, A.; LAW, T. C.; BRUGNARA, C.; LUX, S. E.; PINKUS, G. S.; PINKUS, J. L.; KINGSLEY, P. D.; PALIS, J.; FLEMING, M. D.; ANDREWS, N. C.; ZON, L. I. Positional cloning of zebrafish ferroportin1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. **Nature**, v. 403, n. 6771, p. 776-81, 2000.

DOVER, G. J. Hemoglobin switching protocols in thalassemia: experience with sodium phenylbutyrate and hydroxyurea. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 850, p. 80-86, 1998.

ECKFELDT, J. H.; WITTE, D. L. Serum iron: would analytical improvement enhance patient outcome? **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 4, p. 505-507, 1994.

EL-AGOUZA, I.; ABU SHAHLA, A.; SIRDAH, M. The effect of iron deficiency anaemia on the levels of haemoglobin subtypes: possible consequences for clinical diagnosis. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 24, n. 5, p. 285-289, 2002.

ELDIBANY, M. M.; TONONCHI, K. F.; JOSEPH, N. J.; RHONE, D. Usefulness of certain red blood cell indices in diagnosing and differentiating thalassemia trait from iron deficiency anemia. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 111, n. 5, p. 676-682, 1999.

ENGLAND, J. M.; FRASER, P. M. Differentiation of iron deficiency from thalassemia trait by routine blood count. **Lancet**, v. 1, n. 7801, p. 449-452, 1973.

ENGLAND, J. M.; FRASER, P. Discrimination between iron deficiency and heterozygous thalassemia syndromes in differential diagnosis of microcytosis. **Lancet**, v. 1, n. 8108, p. 145-148, 1979.

ESCHBACH, J. W. Iron requirements in erythropoietin therapy. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 347–361, 2005.

FAILACE, R. F. **Hemograma: manual de interpretação**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2003. 298p.

FEELDERS, R. A.; KUIPER-KRAMER, E. P.; VAN EIJK, H. G. Structure, function and clinical significance of transferrin receptors. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine : CCLM / FESCC**, v. 37, n. 1, p. 1-10, 1999.

FERGUSON, B. J.; SKIKNE, B. S.; SIMPSON, K. M.; BAYNES, R. D.; COOK, J. D. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 119, n. 4, p. 385–390, 1992.

FINCH, C. A.; STRAY, S.; HUEBERS, H. A.; BELLOTTI, V.; LIPSCHITZ, D. A.; COOK, J. D.; PIPPARD, M. J. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. **The Western Journal of Medicine**, v. 145, n. 5, p. 657–663, 1986.

FITZSIMONS, E. J.; BROCK, J. H. The anaemia of chronic disease. **British Medical Journal**, v. 322, n. 7290, p. 811-812, 2001.

FLEMING, M. D.; ROMANO, M. A.; SU, M. A.; GARRICK, L. M.; GARRICK, M. D.; ANDREWS, N. C. Nramp2 is mutated in the anemic Belgrade rat: evidence of a role for Nramp2 in endosomal iron transport. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 3, p. 1148-1153, 1998.

FLEMING, M. D.; TRENOR, C. C.; SU, M. A.; FOERNZLER, D.; BEIER, D. R.; DIETRICH, W. F.; ANDREWS, N. C. Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. **Nature genetics**, v. 16, n. 4, p. 383-386, 1997.

FLEMING, R. E. Advances in understanding the molecular basis for the regulation of dietary iron absorption. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, n. 2, p. 201-206, 2005.

FLEMING, R. E.; SLY, W. S. Heparin: a putative iron-regulatory hormone relevant to hereditary hemochromatosis and the anemia of chronic disease. **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8160–8162, 2001.

FLUSS, R.; FARAGGI, D.; REISER, B. Estimation of the Youden Index and its associated cut-off point. **Biometrical Journal. Biometrische Zeitschrift**, v. 47, n. 4, p. 458-472, 2005.

FLYNN, M. M.; REPPUN, T. S.; BHAGAVAN, N. V. Limitations of red blood cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 85, n. 4, p. 445-449, 1986.

GANZ, T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 783-788, 2003.

GANZ, T. Hepcidin - a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 171-182, 2005.

GENC, S.; ERTEN, N.; KARAN, M. A.; BESISIK, S. K.; SAKA, B.; TASCIOGLU, C.; SIVAS, A. Soluble transferrin receptor and soluble transferrin receptor-ferritin index for evaluation of the iron status in elderly patients. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 202, n. 2, p. 135-142, 2004.

GIARDINI, C. Treatment of beta-thalassemia. **Current Opinion in Hematology**, v. 4, n. 2, p. 79-87, 1997.

GILES, C. The platelet count and mean platelet volume. **British Journal of Haematology**, v. 48, n. 1, p. 31-37, 1981.

GOODNOUGH, L. T.; NISSENSON, A. R. Anemia and Its Clinical Consequences in Patients with Chronic Diseases. **The American Journal of Medicine**, v. 116, p. s.7A, 2004.

GRAZIADEI, I.; GAGGL, S.; KASERBACHER, R.; BRAUNSTEINER, H.; VOGEL, W. The acute-phase protein alpha 1-antitrypsin inhibits growth and proliferation of human early erythroid progenitor cells (burst-forming units-erythroid) and of human erythroleukemic cells (K562) in vitro by interfering with transferrin iron uptake. **Blood**, v. 83, n. 1, p. 260-268, 1994.

GREEN, R.; KING, R. A new red cell discriminant incorporating volume dispersion for differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor. **Blood Cells**, v. 15, n. 3, p. 481-495, 1989.

GREENBURG, A. G. Pathophysiology of Anemia. **The American Journal Of Medicine**, v. 101, n. 2A, p. 7S-11S, 1996.

GRINBERG, L. N.; NEWMARK, H.; KITROSSKY, N.; RAHAMIN, E.; CHEVION, M.; RACHMILEWITZ, E. A. Protective effects of tea polyphenols against oxidative damage to red blood cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 54, n. 9, p. 973-978, 1997.

GRINBERG, L. N.; RACHMILEWITZ, E. A.; NEWMARK, H. Protective effects of rutin against hemoglobin oxidation. **Biochemical Pharmacology**, v. 48, n. 4, p. 643-649, 1994.

GUNSHIN, H.; MACKENZIE, B.; BERGER, U. V.; GUNSHIN, Y.; ROMERO, M. F.; BORON, W. F.; NUSSBERGER, S.; GOLLAN, J. L.; HEDIGER, M. Cloning and characterization of mammalian proton-coupled metal-ion transporter. **Nature**, v. 388, n. 6641, p. 482-488, 1997.

HAN, A. P.; YU, C.; LU, L.; FUJIWARA, Y.; BROWNE, C.; CHIN, G.; FLEMING, M.; LEBOULCH, P.; ORKIN, S. H.; CHEN, J. J. Heme-regulated eIF2 α kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. **The Embo Journal**, v. 20, n. 23, p. 6909-6918, 2001.

HANDIN, R. J.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. **Blood: principles and practice of hematology**. 2ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304p.

HANLEY, J. A.; MCNEIL, B. J. The meaning and use of the area under a receiver operating characteristic (ROC) curve. **Radiology**, v. 143, n. 1, p. 29-36, 1982.

HARRISON, P. M.; AROSIO, P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1275, n. 3, p. 161-203, 1996.

HARTHOORN-LASTHUIZEN, E. J.; LINDEMANS, J.; LANGENHUIJSEN, M. M. A. C. Zinc protoporphyrin as screening test in female blood donors. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 800-804, 1998.

HARTWELL, S. K.; SRISAWANG, B.; KONGTAWELERT, P.; CHRISTIAN, D.; GRUDPAN, K. Review on screening and analysis techniques for hemoglobin variants and thalassemia. **Talanta**, v. 65, p. 1149-1161, 2005.

HASTKA, J.; LASSERRE, J. J.; SCHWARZBECK, A.; HEHLMANN, R. Central role of zinc protoporphyrin in staging iron deficiency. **Clinical Chemistry**, v. 40, n. 5, p. 768-773, 1994.

HASTKA, J.; LASSERRE, J. J.; SCHWARZBECK, A.; STRAUCH, M.; HEHLMANN R. Zinc protoporphyrin in anemia of chronic disorders. **Blood**, v. 81, n. 5, p. 1200-1204, 1993.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 285-297, 2004.

HIGGINS, P. D. R.; ROCKEY, D. C. Iron deficiency anemia. **Techniques in Gastrointestinal Endoscopy**, v. 5, n. 3, p. 134-141, 2003.

HIGGS, D. R. Gene Regulation in Hematopoiesis: New Lessons from Thalassemia. **Hematology**, p. 1-13, 2004.

HILL, R. J.; WARREN, M. K.; STENBERG, P.; LEVIN, J.; CORASH, L.; DRUMMOND, R.; BAKER, G.; LEVIN, F.; MOK, Y. Stimulation of megakaryocytopoiesis in mice by human recombinant interleukin-6. **Blood**, v. 77, n. 1, p. 42-48, 1991.

HILLIARD, L. M.; BERKOW, R. L. The thalassemia syndromes. **Primary care update for Ob/Gyns**, v. 3, n. 5, p. 157-162, 1996.

HORTON, S.; ROSS, J. The economics of iron deficiency. **Food Policy**, v. 28, p. 51-75, 2003.

HUANG, X. Iron overload and its association with cancer risk in humans: evidence for iron as a carcinogenic metal. **Mutation Research**, v. 533, p. 153-171, 2003.

HUEBERS, H. A.; BEGUIN, Y.; POOTRAKUL, P.; EINSPAHR, D.; FINCH, C. A. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. **Blood**, v. 75, n. 1, p. 102-107, 1990.

HUGMAN, A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 28, n. 2, p. 75-83, 2006.

INUI, Y.; SUEHIRO, T.; KUMON, Y.; HASHIMOTO, K. Platelet volume and urinary prostanoid metabolites in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 1, n. 2, p. 108-112, 1994.

ISHIBASHI, T.; KOZIOL, J. A.; BURSTEIN, S. A. Human recombinant erythropoietin promotes differentiation of murine megakaryocytes in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 79, n. 1, p. 286-289, 1987.

JAMES, J.; LAING, G. Iron deficiency anaemia. **Current Paediatrics**, v. 4, p. 33-37, 1994.

JAYABOSE, S.; GIAVANELLI, J.; LEVENDOGLU-TUGAL, O.; SANDOVAL, C.; OZKAYNAK, F.; VISINTAINER, P. Differentiating iron deficiency anemia from thalassemia minor by using a RDW-based index. **Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 21, n. 4, p. 314, 1999.

JAYARANEE, S.; STHANESHWAR, P. Serum soluble transferrin receptor in hypochromic microcytic anaemia. **Singapore Medical Journal**, v. 47, n. 2, p. 138-142, 2006.

JOB, F. O metabolismo do ferro- Atualização. *Boletim*, v. 10, p. 108-114, 1988.

JOSHI, D. D.; NICKERSON, H. J.; MCMANUS, M. J. Hydrops fetalis caused by homozygous α -thalassemia and Rh antigen alloimmunization. **Clinical Medicine & Research**, v. 2, n. 4, p. 228-232, 2004.

JUNCA, J.; FERNANDEZ-AVILES, F.; ORIOL, A.; NAVARRO, J. T.; MILLA, F.; SANCHO, J. M.; FELIU, E. The usefulness of the serum transferrin receptor in detecting iron deficiency in the anemia of chronic disorders. **Haematologica**, v. 83, n. 8, p. 676–680, 1998.

KACENA, M. A.; HOROWITZ, M. C. The role of megakaryocytes in skeletal homeostasis and rheumatoid arthritis. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, n. 4, p. 405-410, 2006.

KAPSORITAKIS, A. N.; KOUKOURAKIS, M. I.; SFIRIDAKI, A.; POTAMIANOS, S. P.; KOSMADAKI, M. G.; KOUTROUBAKIS, I. E.; KOUROUMALIS, E. A. Mean platelet volume: a useful marker of inflammatory bowel disease activity. **The American Journal of Gastroenterology**, v. 96, n. 3, p. 776-781, 2001.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin. **The New England Journal of Medicine**, v. 339, n. 11, p. 746-754, 1998.

KAUSHANSKY, K. Thrombopoietin: the primary regulator of platelet production. **Blood**, v. 86, n. 2, p. 419-431, 1995.

KIS, A. M.; CARNES, M. Detecting iron deficiency in anemic patients with concomitant medical problems. **Journal of general internal medicine : official journal of the Society for Research and Education in Primary Care Internal Medicine**, v. 13, n. 7, p. 455-461, 1998.

KLAUSNER, R. D.; ROUAULT, T. A.; HARFORD, J. B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism. **Cell**, v. 72, v. 1, p. 19–28, 1993.

KNUTSON, M. D.; OUKKA, M.; KOSS, L. M.; AYDEMIR, F.; WESSLING-RESNICK, M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 5, p. 1324–1328, 2005.

KONIJN, A. M.; GLICKSTEIN, H.; VAISMAN, B.; MEYRON-HOLTZ, E. G.; SLOTKI, I. N.; CABANTCHIK, Z. I. The cellular labile iron pool and intracellular ferritin in K562 cells. **Blood**, v. 94, n. 6, p. 2128–2134, 1999.

KOTISAARI, S.; ROMPPANEN, J.; PENTTILA, I.; PUNNONEN, K. The Advia 120 red blood cells and reticulocyte indices are useful in diagnosis of iron-deficiency anemia. **European Journal of Haematology**, v. 68, n. 3, p. 150-156, 2002.

KUSHNER, I. The phenomenon of the acute phase response. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 389, p. 39-48, 1982.

LABBÉ, R. F.; RETTMER, R. L. Zinc protoporphyrin: a product of iron deficient erythropoiesis. **Seminars in Hematology**, v. 26, n. 1, p. 40–46, 1989.

LABBÉ, R. F.; VREMAN, H. J.; STEVENSON, D. K. Zinc Protoporphyrin: a metabolite with a mission. **Clinical Chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2060-2072, 1999.

LAFFERTY, J. D.; CROWTHER, M. A.; ALI, M. A.; LEVINE, M. The evaluation of various mathematical RBC indices and their efficacy in discriminating between thalassemic and non-thalassemic microcytosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 106, n. 2, p.201-205, 1996.

LIMA, C. S. P.; REIS, A. R. C.; GROTTTO, H. Z. W.; SAAD, S. T. O.; COSTA, F. F. Comparison of red cell distribution width and a red cell discriminant function incorporating volume dispersion for distinguishing iron deficiency from beta thalassemia trait in patients with microcytosis. **São Paulo Medical Journal**, v. 114, n. 5, p. 1265-1269, 1996.

LIU, T. C.; SEONG, P. S.; LIN, T. K. The erythrocyte cell hemoglobin distribution width segregates thalassemia traits from other nonthalassemic conditions with microcytosis. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 107, n. 5, p. 601-607, 1997.

LOO, M.; BEGUIN, Y. The effect of recombinant human erythropoietin on platelet counts is strongly modulated by the adequacy of iron supply. **Blood**, v. 93, n. 10, p. 3286-3293, 1999.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia- Propedêutica e Clínica**. 3.ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003. 655p.

LUCARELLI, G.; ANDREANI, M.; ANGELUCCI, E. The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. **Blood Reviews**, v. 16, n. 2, p. 81-85, 2002.

LUDWICZEK, S.; AIGNER, E.; THEURL, I.; WEISS, G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 4148–4154, 2003.

MACIEJEWSKI, J. P.; SELLERI, C.; SATO, T.; CHO, H. J.; KEEFER, L. K.; NATHAN, C. F.; YOUNG, N. S. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 96, n. 2, p. 1085-1092, 1995.

MADAN, N.; SIKKA, M.; SHARMA, S.; RUSIA, U. Phenotypic expression of hemoglobin A₂ in beta-thalassemia trait with iron deficiency. **Annals of Hematology**, v. 77, n. 3, p. 93-96, 1998.

MARENGO-ROWE, A. J. The thalassemias and related disorders. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 20, n. 1, p. 27-31, 2007.

MARGOLIS, D. J.; BILKER, W.; BOSTON, R.; LOCALIO, R.; BERLIN, J. A. Statistical characteristics of area under the receiver operating characteristic curve for a simple prognostic model using traditional and bootstrapped approaches. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 55, n. 5, p. 518–524, 2002.

MARTIN, J. F.; BATH, P. M.; BURR, M. L. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. **Lancet**, v. 338, n. 8780, p. 1409-1411, 1991.

MARTIN, J. F.; TROWBRIDGE, E. A.; SALMON, G.; PLUMB, J. The biological significance of platelet volume: its relationship to bleeding time, platelet thromboxane B₂ production and megakaryocyte nuclear DNA concentration. **Thrombosis Research**, v. 32, n. 5, p. 443-460, 1983.

MAST, A. E.; BLINDER, M. A.; GRONOWSKI, A. M.; CHUMLEY, C.; SCOTT, M. G. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. **Clinical Chemistry**, v. 44, n. 1, p. 45–51, 1998.

MEANS Jr., R. T. Hepcidin and anaemia. **Blood Reviews**, v. 18, n. 4, p. 219–225, 2004.

MEANS Jr., R. T. Recent developments in the anemia of chronic disease. **Current Hematology Reports**, v. 2, n. 2, p. 116–121, 2003.

MEANS Jr., R. T.; KRANTZ, S. B. Inhibition of human erythroid colony formation units by IFN-gamma can be corrected by human recombinant erythropoietin. **Blood**, v. 78, n.10, p. 2564-2567, 1991.

MEANS Jr., R. T.; KRANTZ, S. B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. **Blood**, v. 80, n. 7, p. 1639-1647, 1992.

MELO, M. R.; PURINI, M. C.; CANÇADO, R. D.; KOORO, F.; CHIATTONE, C. S. Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 48, n. 3, p. 222-224, 2002.

MENTZER, W. C. J. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait. **Lancet**, v. 1, n. 7808, p. 882, 1973.

MILMAN, N. Iron prophylaxis in pregnancy - general or individual and in which dose? **Annals of Hematology**, v. 85, n. 12, p. 821-828, 2006.

MIRET, S.; SIMPSON, R. J.; MCKIE, A. T. Physiology and molecular biology of dietary iron absorption. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 23, p. 283-301, July, 2003.

MOHAMMADIAN, S.; BAZRAFSHAN, H. R.; SADEGHI-NEJAD, A. Endocrine gland abnormalities in thalassemia major: a brief review. **Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism : JPEM**, v. 16, n. 7, p. 957-964, 2003.

MOLDAWER, L. L.; MARANO, M. A.; WEI, H.; FONG, Y.; SILEN, M. L.; KUO, G.; MANOGUE, K. R.; VLASSARA, H.; COHEN, H.; CERAMI, A.; *et al.* Cachectin/tumor necrosis factor-alpha alters red blood cell kinetics and induces anemia in vivo. **The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 3, n. 5, p. 1637–1643, 1989.

MORLEY, J. J.; KUSHNER, I. Serum C-reactive protein levels in disease. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 389, p. 406-418, 1982.

MOURA, E.; NOORDERMEER, M. A.; VERHOEVEN, N.; VERHEUL, A. F.; MARX, J. J. Iron release from human monocytes after erythrophagocytosis in vitro: an investigation in normal subjects and hereditary hemochromatosis patients. **Blood**, v. 92, n. 7, p. 2511–2519, 1998.

NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. 1.ed. São Paulo: Sarvier, 1997. 171p.

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K.; GANZ, T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 9, p. 1271-1276, 2004.

NEMETH, E.; TUTTLE, M. S.; POWELSON, J.; VAUGHN, M. B.; DONOVAN, A.; WARD, D. M.; GANZ, T.; KAPLAN, J. Hepcidin regulates iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. **Science**, v. 306, n. 5704, p. 2090–2093, 2004.

NEMETH, E.; VALORE, E. V.; TERRITO, M.; SCHILLER, G.; LICHTENSTEIN, A.; GANZ, T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2461-2463, 2003.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A.; VAULONT, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 15, p. 8780-8785, 2001.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; PORTEU, A.; MATIVET, S.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; SIRITO, M.; SAWADOGO, M.; KAHN, A.; VAULONT, S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4596-4601, 2002.

NICOLAS, G.; CHAUVET, C.; VIATTE, L.; DANAN, J. L.; BIGARD, X.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; VAULONT, S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 1037-1044, 2002.

NOBILI, B.; PERROTTA, S.; MATARESE, S. M. R.; CONTE, M. L.; GIUDICE, E. M. Evaluation of body iron status in Italian carriers of beta-thalassemia trait. **Nutrition Research**, v. 21, p. 55-60, 2001.

OLIVARES, M.; WALTER, T.; COOK, J. D.; HERTRAMPF, E.; PIZARRO, F. Usefulness of serum transferrin receptor and serum ferritin in diagnosis of iron deficiency in infancy. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 5, p. 1191-1195, 2000.

OLIVEIRA, R. A. G; NETO, A. P. **Anemias e Leucemias - Conceitos Básicos e Diagnóstico por técnicas laboratoriais**. São Paulo: Roca, 2004. 421p.

OLIVIERI, N. F. The β -thalassemias. **The New England Journal of Medicine**, v. 341, n. 2, p. 99-109, 1999.

OPPENHEIMER, S. J. Iron and its relation to immunity and infectious disease. **The Journal of Nutrition**, v. 131, p. 616-635, 2001.

ORKIN S. H. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. **Nature Reviews Genetics**, v. 1, n. 1, p. 57-64, 2000.

PAN, L. L.; ENG, H. L.; KUO, C. Y.; CHEN, W. J.; HUANG, H. Y. Usefulness of brilliant cresyl blue staining as an auxiliary method of screening for α -thalassemia. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 145, n. 2, p. 94-97, 2005.

PEKKANEN, J.; PEARCE, N. Defining asthma in epidemiological studies. **The European Respiratory Journal: official journal of the European Society for Clinical Respiratory Physiology**, v. 14, n. 4, p. 951-957, 1999.

PERKINS, N. J.; SCHISTERMAN, E. F. The inconsistency of "optimal" cutpoints obtained using two criteria based on the receiver operating characteristic curve. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 7, p. 670-675, 2006.

PERLMAN, M. K.; SCHWAB, J. G.; NACHMAN, J. B.; RUBIN, C. M. Thrombocytopenia in children with severe iron deficiency. **Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 24, n. 5, p. 380-384, 2002.

PETTERSSON, T.; TEPPON, A. M.; SIIMES, M. A. Circulating transferrin receptor during erythropoietin medication of anemic patients with rheumatoid arthritis. **Scandinavian Journal of Rheumatology**, v. 25, n. 5, p. 321-324, 1996.

PIGEON, C.; ILYIN, G.; COURSELAUD, B.; LEROYER, P.; TURLIN, B.; BRISSOT, P.; LOREAL, O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7811–7819, 2001.

POSS, K. D.; TONEGAWA, S. Heme oxygenase I is required for mammalian iron reutilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 20, p. 10919-10924, 1997.

PROVAN, D. Mechanisms and management of iron deficiency anemia. **British Journal of Haematology**, v. 105, s. 1, p. 19–26, 1999.

PUNNONEN, K.; IRJALA, K.; RAJAMAKI, A. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. **Blood**, v. 89, n. 3, p. 1052–1057, 1997.

QUIGLEY, J. G.; YANG, Z.; WORTHINGTON, M. T.; PHILLIPS, J. D.; SABO, K. M.; SABATH, D. E.; BERG, C. L.; SASSA, S.; WOOD, B. L.; ABKOWITZ, J. L. Identification of a human heme exporter that is essential for erythropoiesis. **Cell**, v. 118, n. 6, p. 757-766, 2004.

QUINTÓ, L.; APONTE, J. J.; MENENDEZ, C.; SACARLAL, J.; AIDE, P.; ESPASA, M.; MANDOMANDO, I.; GUINOVART, C.; MACETE, E.; HIRT, R.; URASSA, H.; NAVIA, M. M.; THOMPSON, R.; ALONSO, P. L. Relationship between haemoglobin and haematocrit in the definition of anemia. **Tropical Medicine and International Health**, v. 11, n. 8, p. 1295-1302, 2006.

RACKE, F. K. EPO and TPO sequences do not explain thrombocytosis in iron deficiency anemia. **Journal of pediatric hematology/oncology : official journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, n. 11, p. 919, 2003.

RANGANATH, L. R.; CHRISTOFIDES, J.; SEMPLE, M. J. Increased mean platelet volume after oestrogen replacement therapy. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 555-560, november, 1996.

RAVEL, R. **Laboratório Clínico: Aplicações Clínicas dos dados laboratoriais**. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. 616p.

REMACHA, A. F.; SARDA, M. P.; PARELLADA, M.; UBEDA, J.; MANTEIGA, R. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. **Haematologica**, v. 83, n. 11, p. 963–966, 1998.

RENZI, R. M.; KAYE, W.; GREENBURG, A. G. Oxygen utilization in the critically ill patient. **Surgical Intensive Care**, p. 211-216, 1993.

RICHARD LEE, G. Iron deficiency and iron deficiency anemia. In: RICHARD LEE, G.; FOESTER, J.; LUKENS, J.; PARASKEVAS, F.; GREER, J. P.; RODGERS, G. M. (ED.) **Wintrobe's clinical hematology**. 10.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. p. 979.

ROCKEY, D. C. Gastrointestinal tract evaluation in patients with iron deficiency anemia. **Seminars in gastrointestinal disease**, v. 10, n. 2, p. 53-64, 1999.

ROCKEY, D. C. Treatment of iron deficiency. **Gastroenterology**, v. 130, n. 4, p. 1367-1368, 2006.

RODRIGUEZ, R. M.; CORWIN, H. L.; GETTINGER, A.; CORWIN, M. J.; GUBLER, D.; PEARL, R. G. Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of anemia of critical illness. **Journal of Critical Care**, v. 16, n. 1, p. 36-41, 2001.

RON, D. Translational control in the endoplasmic reticulum stress response. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 10, p. 1383-1388, 2002.

ROSNER, F.; GRUNWALD, H. W. The patient with anemia. **Medical Update for Psychiatrist**, v. 2, n. 6, p. 177-180, 1997.

ROY, C. N.; WEINSTEIN, D. A.; ANDREWS, N. C. The molecular biology of the anemia of chronic disease: a hypothesis. **Pediatric Research**, v. 53, n. 3, p. 507-512, 2003.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. New trends in the treatment of β -thalassemia. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 33, n. 2, p. 105-118, 2000.

R'ZIK, S.; BEGUIN, Y. Serum soluble transferrin receptor concentration is an accurate estimate of the mass of tissue receptors. **Experimental Hematology**, v. 29, n. 6, p. 677-685, 2001.

R'ZIK, S.; LOO, M.; BEGUIN, Y. Reticulocyte transferrin receptor (TfR) expression and contribution to soluble TfR levels. **Haematologica**, v. 86, n. 3, p. 244-251, 2001.

SALONEN, J. T.; NYSSONEN, K.; SALONEN, R. Body iron stores and the risk of coronary heart disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 331, n. 17, p. 1159, 1994.

SARNAIK, S. A. Thalassemia and related hemoglobinopathies. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 72, n. 4, p. 319-324, 2005.

SCHRIER, S. L.; ANGELUCCI, E. New strategies in the treatment of the thalassemias. **Annual Review of Medicine**, v. 56, p. 157-171, 2005.

SCOTT, M. D.; EATON, J. W. Thalassaemic erythrocytes: cellular suicide arising from iron and glutathione-dependent oxidation reactions? **British Journal of Haematology**, v. 91, n. 4, p. 811-819, 1995.

SHARPE, P. C.; DESAI, Z. R.; MORRIS, T. C. M. Increase in mean platelet volume in patients with chronic renal failure treated with erythropoietin. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 2, p. 159-161, 1994.

SHIH, Y. J.; BAYNES, R. D.; HUDSON, B. G.; FLOWERS, C. H.; SKIKNE, B. S.; COOK, J. D. Serum transferrin receptor is a truncated form of tissue receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 31, p. 19077– 19081, 1990.

SHINE, I.; LAL, S. A strategy to detect beta-thalassaemia minor. **Lancet**, v. 1, n. 8013, p. 692-694, 1977.

SKIKNE, B. S.; FLOWERS, C. H.; COOK, J. D. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. **Blood**, v. 75, n. 9, p. 1870–1876, 1990.

SOARES, J. F.; SIQUEIRA, A. L. **Introdução à estatística médica**. 2.ed. Belo Horizonte: Coopmed, 2002. 300p.

SRIVASTAVA, P. C.; BEVINGTON, J. M. Iron deficiency and/or thalassaemia trait. **Lancet**, v. 1, n. 7807, p. 832, 1973.

SUOMINEN, P.; MOTTONEN, T.; RAJAMAKI, A.; IRJALA, K. Single values of serum transferrin receptor and transferrin receptor ferritin index can be used to detect true and functional iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. **Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 5, p. 1016– 1020, 2000.

TAPIERO, H.; GATE, L.; TEW, K.D. Iron: deficiencies and requirements. **Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacotherapy**, v. 55, n. 6, p. 324-332, 2001.

TELLINGEN, A. V.; KUENEN, J. C.; KIEVIET, W.; TINTEREN, H. V.; KOOL, M. L.; VASMEL, W. L. Iron deficiency anaemia in hospitalised patients: value of various laboratory parameters differentiation between IDA and ACD. **The Netherlands Journal of Medicine**, v. 59, n. 6, p. 270–279, 2001.

TERAMURA, M.; KOBAYASHI, S.; HOSHINO, S.; OSHIMI, K.; MIZOGUCHI, H. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. **Blood**, v. 79, n. 2, p. 327-331, 1992.

THEIL, E. C. Targeting mRNA to regulate iron and oxygen metabolism. **Biochemical Pharmacology**, v. 59, n. 1, p. 87-93, 2000.

THOMPSON, C. B.; LOVE, D. G.; QUINN, P. G.; VALERI, C. R. Platelet size does not correlate with platelet age. **Blood**, v. 62, n. 2, p. 487-494, 1983.

TILLYER, M. L.; TILLYER, C. R. Use of red cell distribution width and erythrocyte zinc protoporphyrin in differential diagnosis of α and β thalassaemia and iron deficiency. **Journal of Clinical Pathology**, v. 47, n. 3, p. 205-208, 1994.

TIMURAGAOGLU, A.; COBAN, E.; ERBASAN, F. The importance of platelet indexes in discriminating between β -thalassaemia trait and iron deficiency anemia. **Acta Haematologica**, v. 111, n. 4, p. 235-236, 2004.

TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, v. 99, n. 10, p. 3505-3516, 2002.

TRENT, R. J. A. Diagnosis of the haemoglobinopathies. **The Clinical biochemist. Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists**, v. 27, n. 1, p. 27-38, 2006.

TROWBRIDGE, E. A.; MARTIN, J. F. The platelet volume distribution: a signature of the prethrombotic state in coronary heart disease? **Thrombosis and Haemostasis**, v. 58, n. 2, p. 714-717, 1987.

TUZMEN, S.; SCHECHTER, A. N. Genetic diseases of hemoglobin: diagnostic methods for elucidating β -thalassaemia mutations. **Blood Reviews**, v. 15, n. 1, p. 19-29, 2001.

UC, A.; STOKES, J. B.; BRITIGAN, B. E. Heme transport exhibits polarity in caco-2 cells: evidence for an active and membrane protein-mediated process. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 287, n. 6, p. G1150-G1157, 2004.

WEATHERALL, D. J. ABC of clinical haematology. The hereditary anaemias. **British Medical Journal**, v. 314, n. 7079, p. 492-496, 1997.

WEATHERALL, D. J. Pathophysiology of thalassaemia. **Baillière's clinical haematology**, v. 11, n. 1, p. 127-146, 1998.

WEATHERALL, D. J. Single gene disorders or complex traits: lessons from the thalassaemias and other monogenic diseases. **British Medical Journal**, v. 321, p. 1117-1120, 2000.

WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Inherited haemoglobin disorders: an increasing global health problem. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 704-712, 2001.

WEINBERG, E. D. Iron loading and disease surveillance. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, n. 3, p. 346-352, 1999.

WEINSTEIN, D. A.; ROY, C. N.; FLEMING, M. D.; LODA, M. F.; WOLFSDORF, J. I.; ANDREWS, N. C. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. **Blood**, v. 100, n. 10, p. 3776–3781, 2002.

WEISS, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Haematology**, v. 18, n. 2, p. 183-201, 2005.

WEISS, G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. **Blood Reviews**, v. 16, n. 2, p. 87-96, 2002.

WIEL, A. V. Anemia in critically ill patients. **European Journal of Internal Medicine**, v. 15, n. 8, p. 481– 486, 2004.

WONG, S. S.; QUTISHAT, A. S.; LANGE, J.; GORNET, T. G.; BUJA, L. M. Detection of iron-deficiency anemia in hospitalized patients by zinc protoporphyrin. **Clinica Chimica Acta**, v. 244, n. 1, p. 91-101, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO: Iron deficiency anaemia: Assesment, Prevention and Control. A guide for programme managers, 2001. Disponível em: <[http://search.who.int/search?iron deficiency](http://search.who.int/search?iron%20deficiency)>. Acesso em: 02 set.2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Disponível em: <[http://www.who.int/water sanitation health/diseases/anemia/en](http://www.who.int/water_sanitation_health/diseases/anemia/en)>. Acesso em: 10 fev.2007.

WORWOOD, M. The laboratory assessment of iron status – an update. **Clinica Chimica Acta**, v. 259, n. 1-2, p. 3-23, 1997.

YERMIAHU, T.; BEN-SHALOM, M.; PORATH, A.; VARDI, H.; BOANTZA, A.; MAZOR, D.; MEYERSTEIN, N. Quantitative determinations of microcytic-hypochromic red blood cell population and glycerol permeability in iron deficiency anemia and β thalassemia minor. **Annals of Hematology**, v. 78, n. 10, p. 468-471, 1999.

YUN, B. G.; MATTS, J. A. B.; MATTS, R. L. Interdomain interactions regulate the activation of the heme-regulated eIF2 α kinase. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1725, n. 2, p. 174-181, 2005.

ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e prática**. ed. rev. atual. São Paulo: Atheneu, 2005. 1081p.

9 APÊNDICE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto:

Anemias Microcíticas e Hipocrômicas

Introdução

Você está sendo convidado(a) a participar voluntariamente de um estudo de pesquisa.

Antes de obter seu consentimento, é importante que todas as informações a seguir sejam lidas com atenção e que todas as dúvidas sejam esclarecidas.

Objetivo do Estudo

O principal objetivo deste estudo é caracterizar as anemias microcíticas e hipocrômicas quanto ao metabolismo do ferro e perfil hemoglobínico.

Apesar da anemia não ser considerada uma condição clínica severa pela maioria dos médicos, ela é mais comum do que imaginamos ser e ainda existe muito a se descobrir sobre esse tema.

Participação no Estudo

Este estudo destina-se a indivíduos com idade superior a 18 anos realizando exames de rotina no Laboratório do Hospital Governador Israel Pinheiro e que apresentem anemia caracterizada pelo exame chamado hemograma.

Aproximadamente 200 pacientes serão requeridos no estudo.

A sua participação é totalmente voluntária e você tem a liberdade de não querer que seu sangue seja empregado para esta pesquisa, ou seja, que a sua amostra de sangue seja apenas utilizada para os exames que seu médico solicitou. Você não terá qualquer prejuízo por esta decisão.

Você não receberá nenhum pagamento pela sua participação neste estudo, bem como não terá nenhum tipo de gasto.

Confidencialidade

Todas as informações obtidas serão mantidas em poder da pesquisadora principal e dos profissionais envolvidos com o projeto de pesquisa, sendo que você terá acesso a elas sempre que desejar. Os resultados deste estudo serão apresentados em relatório de estudo clínico. Sua identidade ficará em sigilo (segredo). Seus dados pessoais não serão mostrados no relatório e em nenhuma publicação do estudo.

Riscos e Desconfortos

Você não corre qualquer tipo de risco por participar desta pesquisa. Somente sua amostra de sangue colhida para exames de rotina será usada para a pesquisa, portanto não requer amostra adicional. Caso ocorra a formação de petéquias no local da punção venosa devido à coleta para seus exames de rotina, aconselha-se colocar uma compressa de gelo no local. Com o passar do tempo as petéquias desaparecerão.

Benefícios

Embora a informação coletada neste estudo possa não trazer benefícios diretamente a você, os resultados podem ajudar profissionais da área de saúde a otimizar o diagnóstico diferencial entre as várias anemias utilizando-se, muitas vezes como único parâmetro um hemograma; uma vez que grande parcela da população não dispõe de recursos para exames mais detalhados.

Revisão do Estudo

Este estudo foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG). Este Comitê de Ética é um grupo de pessoas que seguem regras do Ministério da Saúde do Brasil para garantir os direitos dos participantes de estudos de pesquisa.

Contato para mais informações relacionadas ao estudo

Caso você precise esclarecer qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato a qualquer momento com:

Nome: Januária Fonseca Matos (pesquisadora principal)

Endereço: Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte/ MG

Telefones: 3499-6900 e 9706-0783

Você tem o direito de ligar para o Comitê de Ética do Hospital para esclarecimento de dúvidas sobre seus direitos como participante e sobre o aspecto ético deste estudo.

Nome: Dra Magali de Oliveira Lima

Endereço: Alameda Ezequiel Dias, 225; CEP: 30130-110. Belo Horizonte, MG.

Telefone: 3237-2145

CONSENTIMENTO

Declaro que li e entendi as informações acima. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu recebi uma cópia deste formulário de consentimento assinado, para guardar. Após convenientemente esclarecido pelo pesquisador consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

Assinatura do paciente do estudo

Data da assinatura

Nome do paciente do estudo (letra de forma)

Assinatura da pessoa que conduziu a discussão
do consentimento

Data da assinatura

Nome da pessoa que conduziu a discussão
do consentimento

Assinatura da testemunha ou responsável,
se necessário

Data da assinatura

Nome da testemunha ou responsável,
se necessário

Data da assinatura

10 ANEXO