LUCAS LOBATO ACATAUASSÚ NUNES

**Impacto da sobrecarga de ferro no tecido hepático,
miocárdico e ósseo de pacientes em hemodiálise**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Pós-Graduação da disciplina
de Nefrologia da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti

São Paulo

2019

LUCAS LOBATO ACATAUASSÚ NUNES

**Impacto da sobrecarga de ferro no tecido hepático,
miocárdico e ósseo de pacientes em hemodiálise**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em
Ciências

Programa de Pós-Graduação da disciplina
de Nefrologia da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo

Orientador: Prof^a Dr^a Vanda Jorgetti

(Versão corrigida. Resolução CoPGr 5890, de 20 de dezembro de 2010.

A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP)

São Paulo

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Nunes, Lucas Lobato Acatauassu

Impacto da sobrecarga de ferro no tecido
hepático, miocárdico e ósseo de pacientes em
hemodiálise / Lucas Lobato Acatauassu Nunes. - São
Paulo, 2019.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Programa de Nefrologia.

Orientadora: Vanda Jorgetti.

Descritores: 1.Distúrbio mineral ósseo na doença
renal crônica 2.Espectroscopia de ressonância
magnética 3.Diálise renal 4.Sobrecarga de ferro
5.Biópsia óssea

USP/FM/DBD-333/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais **Fernando** e **Ana Luiza**, que sempre me incentivaram a estudar, embarcaram comigo nesta difícil jornada da pós-graduação e me ensinaram a ir atrás dos sonhos com determinação, ética e respeito para com o próximo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela vida, pelas bênçãos e oportunidades concedidas e por sempre me mostrar o caminho nos momentos em que tudo parecia perdido.

À minha orientadora, **Profa Dra Vanda Jorgetti**, um ser humano ímpar, pois consegue ser pesquisadora e medica exemplar, além de uma verdadeira mãe, com conselhos e orientações que fogem da parte profissional. Lhe conhecer de fato foi uma benção. Obrigado por “me adotar” e me dar broncas quando necessário, obrigado por não desistir quando parecia que não ia dar certo, obrigado por compreender as minhas limitações e me ajudar a superá-las. Obrigado por fazer o meu sonho se tornar realidade.

À **Dra Melani R Custodio**, por me apresentar este fascinante mundo do ferro, me “ceder” o seu projeto e me auxiliar em tudo, no aprendizado e realização da biópsia óssea, na busca dos pacientes, no compartilhamento de conhecimentos, lições de vida e no incentivo para realizar este trabalho. Sem a sua ajuda não seria possível que este sonho se realizasse.

À **Dra Rosa Affonso Moysés**, pelos conselhos, conhecimento compartilhado e apoio em todos os momentos.

À **Meire, Ivone, Luciene e Wagner** por toda a atenção e ajuda essenciais para o desenvolvimento dessa tese.

Aos **colegas e amigos** do Ambulatório de Doença Mineral Óssea por todo o conhecimento dividido e por fazer as terças feiras um momento especial. Em especial a **Carolina Wagner** que me auxiliou com as biópsias ósseas e a Hanna na interminável contagem de ferro.

Aos **meus pais, irmão e cunhada** que sempre estiveram presentes com incentivo e ajuda para que este momento acontecesse.

À **Elyne**, que embarcou comigo nesta jornada e mesmo nos momentos de ausência física com as viagens compreendeu e me apoiou sempre.

Aos **meus amigos** de vida e de profissão, que me auxiliaram no que fosse preciso para a conclusão desta tese.

*“Há que se nutrir carinho por um sofrimento sobre o qual se soube construir a
felicidade”*

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas
Lista de siglas
Lista de símbolos
Lista de figuras
Lista de tabelas
Resumo
Abstract

1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVOS	13
3 PACIENTES E MÉTODOS	15
3.1 Parâmetros avaliados	16
3.1.1 Clínicos	16
3.1.2 Análises Bioquímicas	17
3.1.3 Densitometria óssea	17
3.1.4 Biópsia óssea e análise histomorfométrica	17
3.1.4.1 Parâmetros estáticos	18
3.1.4.2 Parâmetros dinâmicos	20
3.1.5 Ressonância Nuclear Magnética de fígado, coração, medula óssea e crista ilíaca	21
4 RESULTADOS	25
4.1 Avaliação clínica e laboratorial	26
4.2 Densitometria óssea	29
4.3 Avaliação da biópsia óssea	36
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

LISTA DE ABREVIATURAS

AE	Átrio esquerdo
Aj.AR	Taxa de formação óssea corrigida
BFR	Taxa de formação óssea
BFR/BS	Taxa de formação óssea/superfície óssea
BV/TV	Volume ósseo/volume tissular
Ca	Cálcio
CKD-MBD	<i>Chronic Kidney Disease-Mineral Bone Disease</i> <i>dl decilitro</i>
<i>DFO</i>	<i>desferoxamina</i>
DM	Diabetes mellitus
DMO	Densidade Mineral e óssea
DOA	Doença óssea adinâmica
DRC	Doença renal crônica
<i>DXA</i>	<i>Densitometria óssea</i>
<i>EV</i>	<i>Endovenosa</i>
<i>EPO</i>	<i>Eritropoietina</i>
ES/BS	Superfície de erosão/superfície óssea
et al.	e colaboradores
FA	Fosfatase alcalina
Fb.V/TV	Volume de fibrose/volume tissular
Fe	Ferro sérico
FE	fração de ejeção
FGF23	Fator de crescimento de fibroblastos
<i>GRE</i>	<i>gradiente de eco</i>
HA	Hidroxiapatita
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
Hb	Hemoglobina
HD	Hemodiálise
HPN	Hepcidina
HPTS	Hiperparatireoidismo secundário

IMC	Índice de massa corporal
IRP	Proteína reguladora de ferro
KDIGO	Kidney Disease Outcomes Quality Initiative Practice
LIC	concentração de ferro hepático
MAR	Taxa de aposição mineral
Mlt	Intervalo de tempo para mineralização
MS/BS	Superfície mineralizante
O.Th	Espessura osteóide
ObS/BS	Superfície osteoblástica/ Superfície óssea
OcS/BS	Superfície osteoclástica/ Superfície óssea
OF	Osteíte Fibrosa
OV/BV	Volume osteóide/ Volume ósseo
OS/BS	Superfície osteoide/ Superfície óssea
Ob.S/BS	Superfície osteoblástica/ Superfície óssea
P	Fósforo
PCR	Polimerase quantitativa em tempo real
PTH	Paratormônio
PTX	Paratireoidectomia
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNM	Ressonância nuclear magnética
ROI	Regiões de interesse
Tb.N	Número de trabéculas
Tb.Sp	Separação das trabéculas
Tb.Th	Espessura trabecular
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TE	Tempo de Eco
Tfr	1 Receptor
VD	Ventrículo direito
VE	Ventrículo esquerdo

LISTA DE SIGLAS

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
INCOR	Instituto do Coração
INRAD	Instituto de Radiologia
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SIMBOLOS

cm ²	centímetro ao quadrado
dL	decilitro
Hz	hertz
mcg	milicentigrama
mg	miligrama
ml	mililitro
mm	milímetro
mmol	milimol
ms	milissegundo
ng	nanograma
pg	picograma
V	volt
µm	micrometro
±	mais ou menos
%	por cento
>	maior que
<	menor que

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Transporte de Fe no enterócito: O ferro no trato gastro intestinal é absorvido pelo transportador DMT-1 (transportador de metal divalente-1). No enterócito parte se liga com a ferritina parte é transportada para fora da célula através dos canais denominados Ferroportina. Após saída da célula o Fe se acopla com a transferrina para transporte sistêmico. HCP-1: proteína transportadora do heme-1; NU: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor	04
Figura 2	Mecanismo de captação e toxicidade do Fe no tecido cardíaco. O Fe livre é transportado para o meio intracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (LVDC) e se liga a ferritina para ser armazenado nos lisossomos. A toxicidade do Fe ocorre quando o sistema de regulação está saturado, levando a lesão nuclear, despolarização e repolarização da célula, lesão da membrana lipossomal com posterior apoptose celular	07
Figura 3	Efeito da sobrecarga de Fe na remodelação óssea. Figura demonstrando o efeito da sobrecarga sistêmica de ferro e estimulação dos precursores de osteoclasto e do aumento de enzimas catalizadoras que aumentam a reabsorção óssea. Na formação óssea observa-se um bloqueio no estímulo osteogênico e na liberação de enzimas e proteínas que estimulem os osteoblastos, levando a diminuição da formação óssea. Este conjunto de eventos leva a diminuição da densidade mineral e óssea, osteoporose e fratura	09
Figura 4	Imagens de RNM de indivíduos normais sem sobrecarga de Fe (painel superior) e de pacientes com sobrecarga (painel inferior). Com aumento de tempo dos sinais (eco) as imagens tendem a escurecer. A presença de Fe faz com que o retorno do sinal (T2*) seja mais rápido levando ao escurecimento da imagem	11

Figura 5	Paciente com sobrecarga de Fe no fígado. Figura A: caracterização dos depósitos de gordura (em azul); Figura B mostra a exclusão da gordura da análise $R2^*$ ($R2^*$ da água); Figura C quantificação do $R2^*$ da gordura. Paciente com DRC avaliado nesse estudo com níveis de 1845 ng/mL	22
Figura 6	a figura mostra o resultados da análise da crista ilíaca do mesmo paciente da Fig 5 com valores alterados de ferritina, Figura A: caracterização dos depósitos de gordura (em azul);Figura B mostra a exclusão da gordura da análise $R2^*$ ($R2^*$ da água); Figura C quantificação do $R2^*$ da gordura. Foram desenhadas áreas de interesse na medula óssea dos componentes ilíacos bilaterais	23
Figura 7	Correlações da ferritina com $T2^*$, $R2^*$ e $R2^*$ Water do fígado e $R2^*$ da crista Ilíaca Direita e Esquerda	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínicas	26
Tabela 2	Características laboratoriais	28
Tabela 3	Resultados da densitometria óssea	29
Tabela 4	Avaliação hepática pela RNM	30
Tabela 5	Avaliação cardíaca pela RNM	31
Tabela 6	Correlações da ferritina e saturação de transferrina com os parâmetros bioquímicos RNM do fígado, coração, densitometria óssea e RNM da crista ilíaca direita e esquerda	32
Tabela 7	Correlações entre os resultados da RNM do fígado e cristas ilíacas	36
Tabela 8	Classificação TMV	36
Tabela 9	Comparação dos resultados bioquímicos e da RNM dos pacientes divididos quando ao tipo de remodelação óssea	38
Tabela 10	Comparação dos resultados bioquímicos e de RNM entre os pacientes com mineralização óssea normal e anormal	40
Tabela 11	Comparação do laboratório e de RNM dos pacientes com volume ósseo normal e baixo	42

RESUMO

NUNES LLA, Impacto da sobrecarga de ferro no tecido hepático, miocárdico e ósseo de pacientes em hemodiálise. [tese] Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2019.

INTRODUÇÃO: A doença renal crônica (DRC) cursa com várias comorbidades, entre elas a anemia, visto que, com a diminuição da função renal há uma queda na produção de eritropoietina (EPO) e ocorrem alterações no metabolismo do ferro (Fe). Nos pacientes em hemodiálise, a prescrição de Fe é indicada para suplementar as necessidades desse elemento mantendo níveis de ferritina superiores a 100 mg/dl e saturação de transferrina maior que 20%. Entretanto, o excesso de Fe, pode gerar Fe livre não ligado a transferrina, e o mesmo se depositar em órgãos como fígado, coração, e medula óssea, com consequente comprometimento da função dos mesmos. Nos pacientes em hemodiálise, o diagnóstico de sobrecarga de Fe, sua significância clínica e decisão terapêutica, tem sido pouco estudados, ao contrário dos pacientes talassêmicos. **OBJETIVOS:** Avaliar se pacientes em hemodiálise com níveis de ferritina iguais ou superiores a 1000 mg/L cursam com sobrecarga de Fe no tecido hepático, cardíaco e na medula óssea além de comprometerem a densidade e a remodelação óssea. **RESULTADOS:** Avaliamos 28 pacientes em hemodiálise com média de idade de $55,8 \pm 13,1$, tempo de hemodiálise de $42,5 \pm 26,5$ e o uso de ferro no ano anterior a entrada no estudo de $311,5 \pm 179,8$ mg/mês. A análise bioquímica evidenciou três pacientes com Hb menor que 9,0 mg/dL e 14 com valores acima de 11,5 mg/dL; seis pacientes com SatFe <30% e 12 pacientes com ferritina >1500 mg/dL; 16 pacientes com PTH <300 pg/mL e oito com >600 pg/dL. A RNM revelou sobrecarga de Fe no fígado e no tecido ósseo de todos os pacientes, mas não no coração. Os níveis de ferritina sérica se correlacionaram com a sobrecarga hepática e óssea. Os resultados da densitometria e da biópsia óssea não foram afetados pela sobrecarga de Fe, no entanto os níveis de Fe sérico se associaram a menor remodelação óssea sugerindo um efeito desse elemento na atividade dos osteoblastos. **CONCLUSÕES:** Níveis de ferritina sérica elevados se relacionam com o depósito no fígado e na medula óssea, porém não no coração.

Descritores: Distúrbio do metabolismo mineral; Doença renal crônica; Ressonância Nuclear Magnética; Hemodiálise; Sobrecarga de ferro; Biópsia óssea;

ABSTRACT

NUNES LLA. Impact of iron overload and on hepatic, myocardial and bone tissue of hemodialysis patients. [thesis] “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUCTION: Chronic kidney disease (CKD) is associated with several comorbidities, including anemia, since with decreased renal function there is a decrease in erythropoietin (EPO) production and changes in iron (Fe) metabolism. In hemodialysis patients, prescription of Fe is indicated to supplement the needs of this element by maintaining ferritin levels above 100 mg/dl and transferrin saturation greater than 20%. However, the excess of Fe can generate free Fe not bound to transferrin, and deposit in organs such as liver, heart, and bone marrow, with consequent impairment of their function. In hemodialysis patients, the diagnosis of Fe overload, its clinical significance and therapeutic decision have been poorly studied, unlike thalassemia patients. **OBJECTIVES:** To assess whether hemodialysis patients with ferritin levels equal to or greater than 1000 mg/l also have Fe overload in liver, heart, and bone marrow, as well as compromise bone density and remodeling. **RESULTS:** We evaluated 28 hemodialysis patients with a mean age of 55.8 ± 13.1 , hemodialysis time of 42.5 ± 26.5 and iron use in the year prior to study enrollment of 311.5 ± 179.8 mg/month. Biochemical analysis showed 3 patients with Hb below 9.0 mg/dl and 14 with values above 11.5 mg/dl; 6 patients with SatFe <30% and 12 patients with ferritin >1500mg/dl; 16 patients with PTH <300pg/ml and eight with >600pg/dl. MRI revealed Fe overload in the liver and bone tissue of all patients but not in the heart. Serum ferritin levels correlated with liver and bone overload. Densitometry and bone biopsy results were not affected by Fe overload; however, serum Fe levels were associated with lower bone remodeling suggesting an effect of this element on osteoblast activity. **CONCLUSIONS:** Elevated serum ferritin levels correlate with liver and bone marrow deposit, but not heart.

Keywords: Mineral metabolism disorder; Chronic kidney disease; Nuclear Magnetic Resonance; Hemodialysis; Iron Overload; Bone Biopsy

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A doença renal crônica (DRC) é definida como qualquer alteração na estrutura e função dos rins, que persista por mais de três meses e que afete a saúde de um indivíduo, independentemente da sua causa. Nas últimas décadas, a DRC evoluiu como um problema de saúde pública global afetando de 10 a 15% da população adulta mundial (1). Vários fatores contribuíram para esse cenário, entre eles, a elevada prevalência de obesidade, hipertensão arterial sistêmica (HAS), *diabetes mellitus* (DM) e a maior longevidade da população. Os pacientes com DRC apresentam uma taxa de mortalidade elevada, além de cursarem com várias comorbidades, entre elas a anemia, uma vez que os rins são os principais produtores do hormônio eritropoietina (EPO), uma glicoproteína que controla a eritropoiese. Dessa forma, a progressão da doença renal obrigatoriamente leva a anemia, que se caracteriza por ser normocrômica e normocítica. (2)

Nesses pacientes a etiologia da anemia é multifatorial e os principais mecanismos envolvidos são: produção insuficiente de EPO, acúmulo de toxinas urêmicas que inibem a síntese de EPO, deficiência de Fe, destruição acelerada de glóbulos vermelhos e supressão da medula óssea. Vários fatores colaboram para a deficiência de Fe, entre eles a má absorção intestinal, as perdas sanguíneas frequentes devido às punções da via de acesso para hemodiálise e a coagulação das membranas de diálise, além do uso contínuo de EPO que, ao estimular a eritropoiese, consome os estoques de Fe (3,4,5).

Metabolismo do Ferro

O Fe é o quarto elemento mais abundante na superfície terrestre e tem um papel fundamental na proliferação e sobrevivência celular. A deficiência de Fe influencia o crescimento celular, aumenta a apoptose e compromete a regulação de enzimas e reações de oxidação-redução, podendo resultar, por exemplo, em anemia. Seu excesso provoca a formação de espécies reativas de oxigênio, agravando a inflamação. Doenças como a talassemia e a hemocromatose cursam com sobrecarga de Fe.

Em condições normais, cerca de 70% do estoque de Fe se encontra na hemoglobina, 20% nas células hepáticas ou nos macrófagos, principalmente sob a forma de ferritina, e 10% na mioglobina nos músculos.

A absorção de Fe ocorre principalmente no duodeno e varia de 1 a 2 mg/dia. Os macrófagos reciclam cerca de 20 a 25 mg do Fe oriundo de hemácias senescentes. O Fe é absorvido como Fe^{2+} usando o transportador divalente de metal 1 (DMT1) e é liberado pela membrana basolateral para a corrente sanguínea pelas ferroportinas (FPN1). Antes de se ligar a transferrina é oxidado por diferentes ferroxidases.

A transferrina é uma glicoproteína composta por 679 aminoácidos que liga dois íons Fe^{3+} e sua captação intracelular é regulado pelo receptor TFR1 (transferrin receptor 1) que se expressa em várias células entre elas os enterócitos e os precursores dos eritrócitos que consomem a maioria do Fe para a síntese de hemoglobina.

A Figura 1 resume os mecanismos envolvidos na absorção intestinal de Fe.

A hepcidina é uma proteína produzida principalmente no fígado, com 25 aminoácidos e considerada uma proteína de fase aguda (proteínas cuja concentração aumenta em resposta à inflamação). Esta proteína regula as concentrações plasmáticas de Fe tendo, assim, um papel fundamental no seu metabolismo e também na inflamação. O alvo molecular da hepcidina é o exportador celular de ferro, a ferroportina. A ligação da hepcidina com a ferroportina favorece sua internalização e degradação levando a diminuição da absorção intestinal de Fe com consequente diminuição dos níveis séricos desse elemento. A concentração sérica de Fe e a inflamação aumentam a síntese de hepcidina (HPN), enquanto que a anemia, hipóxia, sangramento, deficiência de Fe e a EPO, diminuem sua síntese. (5,6,7).

Figura 1. Transporte de Fe no enterócito: O ferro no trato gastro intestinal é absorvido pelo transportador DMT-1 (transportador de metal divalente-1). No enterócito parte se liga com a ferritina parte é transportada para fora da célula através dos canais denominados Ferroportina. Após saída da célula o Fe se acopla com a transferrina para transporte sistêmico. HCP-1: proteína transportadora do heme-1; NU: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor. Adaptado de Fisiologia e metabolismo do ferro. Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2010;32:8-17 (7).

A regulação do metabolismo do Fe pela HPN é fundamental, visto que não dispomos de um mecanismo específico para eliminar o excesso de Fe vindo da dieta ou da degradação das hemácias. Fisiologicamente, o Fe é eliminado pelas secreções corpóreas, fluxo menstrual e descamação das células do epitélio intestinal e epiderme (2,6). Assim, se houver um aumento do aporte de Fe, seja por via intestinal ou parenteral, impreterivelmente, teremos sobrecarga do mesmo, com comprometimento dos órgãos alvos.

Pacientes com DRC apresentam níveis séricos elevados de HPN, seja por diminuição da excreção renal, ou produção elevada uma vez que o estado inflamatório está frequentemente presente nesses pacientes. A HPN favorece a excreção de Fe, diminui a eritropoiese, piora a anemia desses pacientes. Estudos *in vitro* demonstraram que essa proteína modifica os níveis intracelulares de Fe e cálcio (Ca) influenciando o metabolismo e a mineralização óssea. (3,7,8,9)

A deficiência de Fe pode ser avaliada pelos níveis séricos de ferritina e pelo índice de saturação da transferrina (IST). Para os pacientes em diálise, considera-se suficiente os níveis de ferritina sérica superiores a 100 mg/dl e ideais entre 300 e 500 mg/dl. Entretanto, vale ressaltar que a especificidade e a sensibilidade da ferritina e do IST são afetadas por inflamação e também pela desnutrição, situações que frequentemente são observadas nos pacientes com DRC (10,11).

A suplementação de Fe nos pacientes em HD pode ser feita por via oral ou endovenosa (EV). Evita-se a via oral devido a intolerância gástrica aos compostos com Fe e aos elevados níveis de HPN que diminuem sua absorção intestinal.(5,6,7). Assim, a reposição de Fe EV é mais frequente, mas deve ser criteriosa, já que o excesso contribui para o aumento da morbi-mortalidade dos pacientes. O excesso de Fe gera radicais livres aumentando a disfunção endotelial (acelera a ruptura de placas ateroscleróticas) promovendo inflamação e diminuindo a resposta imunológica dos pacientes com DRC. Estudo de Baile e col em 2014 (12) comparou pacientes que recebiam Fe EV acima de 400 mg/mês com aqueles que recebiam 200 mg/mês, revelando aumento da mortalidade no primeiro grupo.

O KDIGO (*Kidney Disease: Improving Global Outcomes*), comitê internacional que desenvolve diretrizes para a prática clínica na Nefrologia (10) preconiza uma reposição de Fe que permita estoques suficientes para a atividade da EPO e consequente eritropoiese e que os níveis séricos de ferritina não excedam 500 mg/dl. Estudos recentes, mostraram que o uso excessivo de Fe EV favorece a sobrecarga, especialmente naqueles pacientes com níveis de ferritina acima do preconizado (13)

Sobrecarga de Fe nos diferentes órgãos

Muito do conhecimento sobre complicações da sobrecarga de Fe vem de estudos de pacientes com talassemia e hemocromatose.

A toxicidade do Fe está relacionada à sua forma livre, ou seja, não ligado à transferrina. Quando a quantidade do Fe ofertada é maior que a capacidade das células de armazená-lo, ocorre saída de Fe para a circulação e, uma vez ultrapassada a saturação da transferrina plasmática, o Fe livre se deposita principalmente no fígado, coração, medula e tecido ósseo, e glândulas endócrinas, como por ex, o pâncreas. (3,13,14)

O fígado é o um dos principais órgãos de armazenamento do Fe, especificamente nas células do sistema reticulo endotelial. A concentração hepática desse elemento se correlaciona com as reservas totais de Fe do organismo. Inicialmente os depósitos ocorrem nas células que revestem os sinusóides e nas células de Kupffer e a medida que a sobrecarga se prolonga atinge os hepatócitos, inicialmente na periferia dos lóbulos hepáticos próximo as tríades portais e depois em todo o lóbulo. (14,15,16)

Quanto ao comprometimento cardíaco as complicações são mais tardias (17). A competição entre o Fe e o Cálcio (Ca) pelos canais de Ca dependentes da voltagem do tipo L, presentes em grande quantidade nos cardiomiocitos, são a base fisiopatológica para a entrada do Fe e consequente sobrecarga. Nessas células grandes quantidades de Fe livre favorecem a maior expressão dos canais de Ca aumentando o transporte do Fe para o interior da célula. Aparentemente o transportador DMT1 também participa da captação de Fe pelos cardiomiocitos embora sua expressão seja pobre nessas células. A Figura 2 descreve os principais mecanismos de captação do Fe pelos cardiomiocitos.

Figura 2. Mecanismo de captação e toxicidade do Fe no tecido cardíaco. O Fe livre é transportado para o meio intracelular pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (LVDC) e se liga a ferritina para ser armazenado nos lisossomos. A toxicidade do Fe ocorre quando o sistema de regulação está saturado, levando a lesão nuclear, despolarização e repolarização da célula, lesão da membrana lipossomal com posterior apoptose celular. Fonte: Adaptado “NY acad Sci 2005; 1054: 387-95 2005” (18)

As principais complicações cardíacas decorrentes da sobrecarga de Fe são: hipertrofia do ventrículo esquerdo, redução da fração de ejeção, enrijecimento ventricular, além de alterações no epicárdio, nos músculos papilares e no septo interventricular. (19,20). Alterações eletrocardiográficas são observadas especialmente bloqueio atrioventricular e de ramo esquerdo com consequente arritmias, mas não são específicas. (19,20, 21,22).

A medula óssea dispõe de grandes quantidades de Fe para a hematopoiese. No entanto, quando em excesso, o Fe favorece a formação de espécies reativas de oxigênio que comprometem a diferenciação de células mesenquimais em osteoblastos e adipócitos. (23).

A osteoporose, doença caracterizada pela baixa massa óssea e deterioração da microarquitetura, aumenta a fragilidade óssea e o risco de fraturas. De 40 a 50% dos pacientes com talassemia desenvolvem osteoporose. (24-28). As causas são multifatoriais e incluem expansão da medula óssea secundária a eritropoiese ineficaz,

anemia, sobrecarga de Fe, hipogonadismo, hipotireoidismo entre outros fatores. Nesses pacientes a função osteoblástica esta diminuída (redução dos níveis de osteocalcina) e a atividade osteoclástica elevada (via Rank/Rankl/osteoprotegerina) o que leva a perda de massa óssea. (29,30,31)

A densitometria óssea é o exame mais usado para diagnóstico de osteoporose. Nos pacientes talassemicos com sobrecarga de Fe os ossos podem ser mais densos pelos depósitos de Fe dificultando a interpretação e o diagnóstico. (2-6) Estudos com biopsia óssea mostraram aumento da espessura e do tempo de maturação da matriz ósteoide, ou seja, comprometimento na mineralização óssea (32,33). A Figura 3 descreve os mecanismos pelos quais o Fe interfere na formação e reabsorção óssea. (34-38)

Figura 3. Efeito da sobrecarga de Fe na remodelação óssea. Figura demonstrando o efeito da sobrecarga sistêmica de ferro e estimulação dos precursores de osteoclasto e do aumento de enzimas catalizadoras que aumentam a reabsorção óssea. Na formação óssea observa-se um bloqueio no estímulo osteogênico e na liberação de enzimas e proteínas que estimulem os osteoblastos, levando a diminuição da formação óssea. Este conjunto de eventos leva a diminuição da densidade mineral e óssea, osteoporose e fratura. Fonte: Adaptado "Front. Pharmacol 2017, 8:77" (39)

Avaliação da sobrecarga de Fe

O KDIGO sugere que, nos pacientes em hemodiálise, a reposição de Fe EV deve ser suficiente para manter níveis de hemoglobina (Hb), entre 9 e 11,5 g/dL, o que implica na administração aproximada de 4 g de Fe/ ano (10). Essa quantidade, acrescida de eventuais transfusões de sangue, pode ser suficiente para levar a sobrecarga de Fe nesses pacientes. Os principais exames usados para avaliar os estoques/sobrecarga de Fe são:

1. Dosagem da ferritina sérica é o exame mais usado na prática clínica para avaliar o metabolismo do Fe sua sobrecarga. É um método quantitativo, reprodutível, sensível e de fácil realização. A ferritina sérica apresenta correlação linear com a quantidade de Fe do organismo, ou seja, 1 ng/mL de ferritina equivale a cerca de 8 a 10 mg de Fe livre. (3).

Os pacientes com DRC apresentam frequentemente dificuldades de vias de acesso para HD, processos infecciosos situações que favorecem a inflamação além do procedimento dialítico, que por si só, também leva a inflamação. Sendo a ferritina uma proteína de fase aguda, esses fatores dificultam a interpretação da dosagem de ferritina como guia para reposição ou avaliação da sobrecarga de Fe. A diretriz KDIGO recomenda que os níveis séricos de ferritina não deve ultrapassar valores de 500 mg/dL. (10,40,41,42)

2. Concentração de Fe por grama de tecido hepático (CHF) (obtido por biópsia hepática) é o método direto mais específico e sensível para avaliar a sobrecarga de Fe e reflete, de maneira bastante fidedigna, a quantidade total de Fe no organismo. Estudos demonstraram que concentrações acima de 15-20 mg ferro/g de tecido hepático se associam com, hepatomegalia, disfunção e fibrose hepática (4,24,42). A experiência no tratamento e acompanhamento de pacientes talassemicos levou a estratificação dos mesmos em distintos grupos de risco, de acordo com o grau de sobrecarga de Fe no tecido hepático (43). Entretanto, a biópsia hepática é uma técnica invasiva e pouco usada na prática clínica

3. Ressonância Nuclear Magnética (RNM). É uma técnica não invasiva usada para formar imagens dos nossos órgãos. A RNM usa campos magnéticos intensos, ondas de rádio e gradientes de campo para gerar essas imagens.

Certos núcleos atômicos, quando colocados em um campo magnético externo conseguem absorver e emitir energia de frequência de rádio. Na RNM os átomos de hidrogênio são usados para gerar o sinal de radiofrequência detectável pelo aparelho. Como é um dos componentes da água, e que também está presente na gordura, o hidrogênio é um dos átomos mais abundantes do nosso corpo. Por esse motivo as varreduras da RNM caracterizam principalmente a localização da água e da gordura no corpo. Suas características são distintas no tecido normal e patológico. (44)

Nos tecidos sem sobrecarga de Fe, o ambiente magnético é razoavelmente homogêneo. Isso significa que os sinais recebidos de diferentes áreas do tecido permanecem coerentes entre si e os sinais duram por mais tempo (imagens brilhantes sem muito contraste). Nos locais com depósitos de Fe, os prótons se orientam em diferentes direções e apresentam perfis magnéticos distintos, interrompendo a coerência entre os prótons e escurecendo a imagem mais rapidamente. A ressonância magnética tem a capacidade de "reorientar" as ondas de radiofrequência dos tecidos em intervalos de tempo específicos conhecidos como tempos de eco. Quanto maior o tempo de eco, mais discordantes são os sinais dos prótons e mais escura será a imagem (Figura 4). Na sobrecarga de Fe a imagem se torna rapidamente escura com tempo de eco menor. Na verdade, esse processo de escurecimento se comporta de maneira semelhante ao material radioativo e pode ser descrito por uma "meia-vida". O aparelho de ressonância magnética pode "ajustar o foco" do sinal de retorno dos prótons usando um pulso de radiofrequência especial (formando um chamado spin eco), ou usando pequenos ímãs especiais conhecidos como gradientes (formando um chamado gradiente de eco). A constante de tempo para um eco de spin é conhecida como T2 e para um gradiente de eco é conhecido como T2*. Os compostos de Fe paramagnéticos produzem distorções locais no campo magnético que encurtam os tempos de relaxamento, isto é, quanto maior o Fe tecidual menor o sinal de meia vida e menor o T2 e T2 *. (45,46)

Figura 4. Imagens de RNM de indivíduos normais sem sobrecarga de Fe (painel superior) e de pacientes com sobrecarga (painel inferior). Com aumento de tempo dos sinais (eco) as imagens tendem a escurecer. A presença de Fe faz com que o retorno do sinal (T2*) seja mais rápido levando ao escurecimento da imagem. Adaptado de "MRI measurement of iron overload. 2007;14(3):183–190"(45)

A avaliação da sobrecarga de Fe pode ser realizada pela taxa de decaimento do sinal em R_2 ou R_2^* , ao invés das meias vidas T_2 ou T_2^* . Essas distinções são puramente técnicas e não relacionadas à imagem em si. Estas taxas de decaimento do sinal são simplesmente os recíprocos de T_2 e T_2^* : $R_2 = 1000 / T_2$ ou $R_2^* = 1000 / T_2^*$. O fator de 1000 é usado porque T_2 e T_2^* são geralmente reportados em ms e as unidades de R_2 e R_2^* são Hertz ou s^{-1} . Portanto, um T_2^* de 20 ms é igual a um R_2^* de 50 Hz e vice-versa. (45-49)

A vantagem de se usar R_2 e R_2^* é que esses parâmetros são diretamente proporcionais a concentração de Fe. Os resultados da RNM no fígado são descritos como os valores de R_2 e R_2^* , enquanto que para o coração são expressos em T_2 e T_2^* , inclusive para pacientes que realizam hemodiálise. (49-55).

Na avaliação efetiva de sobrecarga de ferro pela RNM deve-se levar em conta a presença de gordura local, pois o sinal de gordura contém “múltiplas ressonâncias”, devido aos vários tipos de triglicerídeos, com oscilações nos tempos de emissão e uma queda de sinal sem organização, semelhante ao efeito do Fe no tecido. Assim, na avaliação da imagem da RNM pode-se separar a gordura e da água, suprimindo sua influência no cálculo do R_2^* e melhorando a avaliação da sobrecarga de Fe. (56-62)

Recentemente um estudo que avaliou 604 pacientes em HD submetidos a biópsia óssea para diagnóstico do tipo de osteodistrofia, demonstrou que 30% deles apresentavam depósitos de Fe na medula ou na frente de mineralização (63).

Esse estudo despertou nosso interesse em avaliar o comprometimento de outros órgãos quanto à sobrecarga de Fe, em pacientes tratados com HD.

Outro questionamento se refere ao fato de que a sobrecarga de Fe nos pacientes talassêmicos cursa com osteoporose e alterações na remodelação óssea especialmente na mineralização. O mesmo acontece com pacientes com DRC e sobrecarga de Fe?

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

1: Avaliar se pacientes em hemodiálise com níveis de ferritina iguais ou superiores a 1000 mg/L cursam com sobrecarga de Fe no tecido hepático, cardíaco e ósseo.

2: Avaliar a densidade mineral e a remodelação óssea em pacientes em hemodiálise com níveis de ferritina iguais ou superiores a 1000 mg/L.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3 PACIENTES E MÉTODOS

O presente estudo é uma pesquisa clínica, transversal e não controlada. Os pacientes foram selecionados em 4 centros de diálise da cidade de São Paulo que juntos tratavam 1.436 pacientes.

Os critérios de inclusão foram: pacientes com mais de 18 anos, de ambos os sexos, com pelo menos seis meses de tratamento por HD e com níveis de ferritina sérica igual ou superior a 1000 ng/mL no último ano de tratamento.

Os critérios de exclusão foram: pacientes com doenças neoplásicas, hepáticas (sorologias negativas) ou com síndrome de imunodeficiência adquirida, com transplante renal prévio, uso de Desferroxiamina e intoxicação de alumínio na biópsia óssea.

Após avaliação inicial 108 pacientes preenchiam os critérios de inclusão. No entanto somente 28 assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido(TCLE). Os demais não aceitaram participar alegando dificuldades distintas como por ex a necessidade frequente de se deslocar até o Hospital das Clínicas, ou desinteresse.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Parecer nº 1.906.167)

3.1 Parâmetros avaliados

3.1.1 Clínicos

Os parâmetros clínicos analisados foram idade, sexo, raça, etiologia da doença renal, Índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso (kg)} / \text{altura (m)}^2$) tempo de HD, tipo de acesso para HD. A eficiência da diálise foi avaliada pelo índice KT/V (Clearance de ureia em mL/min x tempo em min/volume de distribuição de ureia em mL). A reposição de Fe se fazia unicamente pela via EV e a administrada nos últimos 12 meses foi anotada e expressa por mês.

3.1.2 Análises Bioquímicas

As análises bioquímicas foram realizadas no Laboratório Central do Instituto Central do Hospital das Clínicas de São Paulo através dos métodos:

- Cálcio total (Ca): Método: colorimétrico / Valor de referência (VR): 8,8-10,6 mg/dL;
- Cálcio iônico: Método Eletrodo íon-seletivo/ VR: 4,49 - 5,29 mg/dL;
- Fósforo (P): Método: colorimétrico automatizado / VR: 2,7- 4,5 mg/dL;
- Fosfatase alcalina total (FA): Método: cinético automatizado / VR: 35-104 U/L;
- PTH-intacto (IMMUNOLITE): Método: imunofluorimétrico – Delfia, USA / VR: 10 a 65 pg/mL.
- 25 (OH) Vitamina D: Químioimunoensaio AR/ VR: 30 ng/mL
- Hemoglobina: Método Automatizado (Lauril Sulfato de Sódio) / VR 11-13 g/dL
- Hematocrito: Método Automatizado. / VR 35-52%
- Ferritina: Método Imunoensaio de eletroquimioluminescência/ VR: 13- 400 ng/mL
- Ferro: Método Ensaio colorimétrico/ VR 50-175
- Transferrina: Método DLC - Bioquímica Clínica/ VR: 200 – 360 mg/dL
- Proteína C reativa (PCR): Método Imunoturbidimetria/ VR < 5,0 mg/L.

3.1.3 Densitometria óssea

A densitometria da coluna lombar, fêmur foi realizada no equipamento HOLOGIC (discovery W – s/n 84419) no Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas-FMUSP (INRAD). A densidade mineral óssea foi mensurada em valor absoluto (g/cm²) e o T score (baseado nos critérios da Organização Mundial de Saúde) foi usado para classificar os pacientes como normais (densidade normal -1,0; osteopenicos (-1,1 ate -2,4) e osteoporoticos (acima de -2,5).

3.1.4 Biopsia óssea e análise histomorfométrica

A biopsia óssea foi realizada na crista ilíaca empregando uma trefina, com diâmetro interno de 7 mm, sob anestesia local com lidocaína 2% e sedação com Midazolan (7,5 mg intramuscular). Os pacientes receberam previamente 2 cursos de

tetraciclina, na dose de 500 mg a cada 12h/12h por 3 dias, separados por 10 dias livres de medicamento - a biópsia foi realizada de 3 a 5 dias após o término do antibiótico. A biópsia óssea foi processada com técnica padronizada que permite analisar o tecido sem descalcificação prévia (64). A análise histomorfométrica foi realizada empregando-se método semi automatizado, com o software *Osteomeasure* (Osteometrics Inc., Atlanta, GA, USA). Essa análise foi realizada no Laboratório de Investigação Médica (LIM) 16 na Faculdade de Medicina da USP. As colorações empregadas foram azul de toluidina para análise dos parâmetros estáticos, a coloração solocromo-azurina e a de Perls para avaliar a depósitos de alumínio e de Fe respectivamente. A presença de mais de 30% das trabéculas recobertas por alumínio foi considerada como intoxicação; assim como a presença de 20% de ferro na medula óssea ou recobrindo as trabéculas. Foram excluídos pacientes que apresentaram sobrecarga de alumínio.

Os parâmetros histomorfométricos estudados foram divididos em estáticos e dinâmicos, sendo os últimos analisados pela marcação com tetraciclina. As denominações dos parâmetros, assim como suas abreviaturas, seguem os propostos pela *American Society for Bone and Mineral Research* (65). Os valores de referência utilizados para os parâmetros estáticos foram os de controles normais locais (66), enquanto que os dinâmicos seguiram os descritos na literatura (67).

3.1.4.1 Parâmetros estáticos

- **Volume ósseo (BV/TV, %):** é o volume ocupado pelo osso trabecular mineralizado e não-mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pela medula óssea e trabéculas. Valor de referência: $21,8 \pm 7,2$ (mulheres); $24 \pm 6,1$ (homens).
- **Espessura trabecular (Tb.Th, μm):** representa a média da espessura das trabéculas. Valor de referência: $126 \pm 28,8$ (mulheres); $127,9 \pm 29,7$ (homens).
- **Separação trabecular (Tb.Sp, μm):** representa a média da distância entre as trabéculas. Valor de referência: $498,3 \pm 195,9$ (mulheres); $420,6 \pm 124,1$ (homens).

- **Número de trabéculas (Tb.N, /mm):** representa a média numérica do número de trabéculas por milímetro. Valor de referência: $1,76 \pm 0,52$ (mulheres); $1,89 \pm 0,42$ (homens).
- **Volume osteóide (OV/BV, %):** é o volume ocupado por osso não mineralizado, expresso como porcentagem do volume ocupado pelo osso trabecular (mineralizado e não-mineralizado). Valor de referência: $1,55 \pm 1,9$ (mulheres); $2,9 \pm 2,7$ (homens).
- **Espessura osteóide (O.Th, μm):** é a espessura do rebordo da matriz osteóide, expressa em micra. Valor de referência: $10,8 \pm 3,2$ (mulheres); $11,7 \pm 3,5$ (homens).
- **Superfície osteóide (OS/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular recoberta por matriz osteóide. Valor de referência: $9,2 \pm 8,4$ (mulheres); $16,1 \pm 12,6$ (homens).
- **Superfície reabsorvida (ES/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta lacunas de reabsorção óssea com a presença ou não de osteoclastos. Valor de referência: $2,3 \pm 2,4$ (mulheres); $1,75 \pm 1,21$ (homens).
- **Superfície osteoblástica (Ob.S/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta osteoblasto. Valor de referência: $1,2 \pm 3,2$ (mulheres); $1,2 \pm 1,4$ (homens).
- **Superfície osteoclástica (Oc.S/BS, %):** define-se da mesma forma que a superfície osteoblástica, aplicando-a aos osteoclastos. Valor de referência: $0,03 \pm 0,06$ (mulheres); $0,03 \pm 0,11$ (homens).
- **Volume de fibrose (Fb.V/TV, %):** é o volume ocupado por tecido medular que apresenta fibrose, expresso como porcentagem do volume total do espaço trabecular (trabéculas + medula óssea). Valor de referência: 0.

3.1.4.2 Parâmetros dinâmicos

- **Superfície mineralizante (MS/BS, %):** é a porcentagem da superfície trabecular que apresenta dupla marcação pela tetraciclina. Valor de referência: 12 ± 5 (mulheres); 18 ± 8 (homens).
- **Taxa de aposição mineral (MAR, $\mu\text{m}/\text{dia}$):** é a espessura do novo osso mineralizado depositado na unidade de tempo, expresso em micras por dia. Valor de referência: $0,65 \pm 0,12$.
- **Taxa de formação óssea (BFR/BS, $\mu\text{m}^3/\mu\text{m}^2/\text{dia}$):** é o volume de osso novo, mineralizado, formado por unidade de superfície trabecular e por unidade de tempo. Valor de referência: $0,07 \pm 0,03$ (mulheres); $0,13 \pm 0,07$ (homens).
- **Taxa de formação óssea corrigida (Aj.AR, $\mu\text{m}/\text{dia}$):** é o volume de osso novo, mineralizado, formado por unidade de área de superfície osteóide e por unidade de tempo. Valor de referência: $0,5 \pm 0,2$.
- **Intervalo de tempo de mineralização (Mlt, dias):** é o intervalo de tempo entre deposição e a mineralização da matriz osteóide. Valor de referência: $23,7 \pm 2,7$ (mulheres); $21,3 \pm 2,3$ (homens).

Para uniformizar as alterações encontradas na biópsia, o KDIGO (10) recomenda o uso da classificação TMV; onde “T” descreve o *turnover* (remodelação) óssea, “M” a mineralização e “V” volume ósseo.

A taxa de remodelação foi calculada a partir da extensão da superfície óssea marcada pela tetraciclina (MS/BS), multiplicada pela distância entre as duas marcações (MAR) ou seja, o BFR. Consideramos que os pacientes tinham remodelação alta quando o BFR era maior que 1 desvio da média para homens ($0,13 \pm 0,07$) e para mulheres ($0,07 \pm 0,03$) e baixa quando os valores eram menores ou iguais a 1 desvio da média.

A mineralização foi avaliada através do MLT. Consideramos mineralização normal quando o MLT era menor que 50 dias e anormal quando maior ou igual a 50 dias.

O volume compreende a quantidade de osso mineralizado ou não entre as duas corticais. O diagnóstico de osteoporose foi definido quando o BV/TV fosse menor que 17,4% para homens e para mulheres 14,7%. (68)

3.1.5 Ressonância Nuclear Magnética de fígado, coração, medula óssea e crista ilíaca

As RNM do fígado, coração medula óssea lombar e das cristas ilíacas foram realizadas no Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da FMUSP (INCOR), utilizando protocolo próprio com o aparelho: RNM com Scanner de 1,5 T (Achieva, Philips Healthcare, Amsterdam, Holanda). A sequência empregada para quantificação dos depósitos de Fe usa a técnica gradiente eco com 8 tempos de eco (TE), iniciando em 2,4 ms e com intervalos de 2,4 ms entre cada TE, Tempo de repetição (TR) muito curto, com Flip Angle de 60 graus, matrix de 320 x 320, espessura de corte de 8 mm e Gap 2mm. A sequência dura cerca de 10-15 s.

As imagens hepáticas foram obtidas na orientação transversal da fatia através do centro na origem principal da veia portal. Não foi utilizado contraste. As regiões de interesse (ROIs) foram desenhadas usando um corte axial, com a maior área do fígado disponível, segmentada manualmente pelo radiologista, evitando vasos sanguíneos de maior calibre e ductos biliares. O processamento das imagens usou o software específico (Dive-in – Magnepath- Perth, Australia) para quantificação do tempo de relaxamento $R2^*$ do fígado. Para esta avaliação, usa um algoritmo que calcula o valor de relaxamento $R2^*$ para a água ($R2^*$ Water), para a gordura ($R2^*$ Fat), sendo os valores corrigidos pela presença de gordura no tecido, além de mensurar a fração de gordura. Esta análise corrige a influência da gordura no valores de $R2^*$ do fígado (e em outros tecidos), diminuindo sua interferência na avaliação da sobrecarga de ferro. (57,58,62) (Figura 5)

A análise $R2^*$ foi transformada em $T2^*$ (cálculo da velocidade do relaxamento transversal dos prótons no fígado) pela fórmula: $R2^* [s^{-1}] 1000 / T2^* [ms]$; e o cálculo

do LIC (Liver Iron Concentration) foi medido pela relação intensidade de sinal do fígado durante sequência spin-eco (SE) ou gradiente-eco (GRE) dividido pela intensidade de sinal de um tecido onde não há acúmulo de Fe empregando a formula: $LIC (mg/g) = R2^* \times 0,0254 + 0,202$ (69)

Os resultados dessa análise permitiram calcular a sobrecarga de Fe em: Ausente(Normal) ($T2^* > 15,4$ ms; $R2^* < 65$ Hz; $LIC < 2,0$ mg/g), Leve ($T2^* 4,5-15,4$ ms; $R2^* 66-224$ Hz; $LIC 2,1-7,0$ mg/g), moderada ($T2^* 2,1-4,5$ ms; $R2^* 225-475$ Hz; $LIC 7,1-15$ mg/g) e grave($T2^* < 2,1$ ms; $R2^* > 476$ Hz; $LIC > 15$ mg/g). (69-71)

Figura 5. Paciente com sobrecarga de Fe no fígado. Figura A: caracterização dos depósitos de gordura (em azul);Figura B mostra a exclusão da gordura da análise R2* (R2* da água); Figura C quantificação do R2* da gordura. Paciente com DRC avaliado nesse estudo com níveis de 1845 ng/mL

Quanto à análise do coração a RNM avaliou: contratilidade cardíaca, com cálculo da fração de ejeção de VD e VE; da via de saída do VE e parâmetros estruturais como espessura de parede lateral e massa de VE, volume de átrio esquerdo, volume sistólico e diastólico final de VE. (72,73 e 74).

A sobrecarga de Fe nesse órgão foi avaliada pela técnica $T2^*$ (Quantificação da variação do tempo de eco em uma mesma imagem) com 8 tempos de eco no eixo curto das regiões basal, medial e apical do septo cardíaco e desenho de região transmural de interesse no septo ventricular. Os resultados dessa análise permitiram dividir a sobrecarga cardíaca de Fe em: Normal (> 20 ms), com sobrecarga leve ($15-20$ ms), sobrecarga moderada ($10-15$ ms) e grave (< 10 ms) (72) Para avaliação do mapa T1 usamos a mesma programação técnica do $T2^*$.As imagens cardíacas

foram avaliadas com o cvi42 software (*Circle Cardiovascular Imaging Inc.*, Calgary, Canada).

A avaliação da medula óssea foi realizada no corpo vertebral de L3 e na região da crista ilíaca posterior direita e esquerda com RNM R2* seguindo as mesmas sequências descritas para o fígado. A avaliação das cristas ilíacas não possuem valor de referencia, a decisão de analisá-las deveu-se a ser o local onde realizamos as biopsias ósseas e ao fato de tentar comparar com os valores da coluna lombar (L3), usados na literatura (75-78). Nessas estruturas as ROI's foram desenhadas manualmente pelo radiologista, evitando a área das corticais. Foram também calculados os valores de R2*, R2*Water, R2*Fat e fração de gordura em cada um dos locais avaliados (Figura 6).

Figura 6. A figura mostra o resultados da análise da crista ilíaca do mesmo paciente da Fig 5 com valores alterados de ferritina, Figura A: caracterização dos depósitos de gordura (em azul); Figura B: mostra a exclusão da gordura da análise R2* (R2* da água); Figura C quantificação do R2* da gordura. Foram desenhadas áreas de interesse na medula óssea dos componentes ilíacos bilaterais.

3.1.6 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão, ou mediana e valores mínimos e máximos, para variáveis com distribuição paramétrica (normal) ou não-paramétrica, respectivamente. O tipo de distribuição foi avaliado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Os parâmetros bioquímicos, histomorfométricos e de imagem (RNM e DXA) foram comparados utilizando o teste t de Student pareado ou teste de

Wilcoxon, quando apropriado. Para avaliar a correlação de parâmetros foi utilizado o teste de significância para o coeficiente de correlação de Spearman. A análise estatística foi realizada nos programas *GraphPad Prism 5.0* e *SPSS for Windows 17.0*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação clínica e laboratorial

Na Tabela 1 descrevemos as características clínicas dos pacientes incluídos no estudo. A maior parte deles, era do sexo masculino, com média de idade de $55,8 \pm 13,1$ anos, não caucasianos, com tempo médio em HD de $42,5 \pm 26,5$ meses. Fistula arteriovenosa era a principal via de acesso nos 28 pacientes para HD, um paciente usava cateter de curta permanência e 5 de longa permanência. No ano anterior ao início do protocolo a média de Fe EV (sacarato hidróxido férrico) recebida mensalmente pelos pacientes foi de 311,5 mg.

Tabela 1. Características clínicas.

Características Clínicas	Frequência	% (N=28)
Sexo		
Feminino	11	39,3%
Masculino	17	60,7%
Faixa etária (anos)		
< 50	7	25,0%
50 a 59	12	42,9%
60 a 69	5	17,9%
> = 70	4	14,3%
Mín / Média $\pm$ DP / Máx	30.0 / 55.8 $\pm$ 13.1 / 81.0	
Cor		
Branca	12	42,9%
Não branca	16	57,1%
Estado nutricional- IMC (m^2/Kg)		
Eutrófico < 25	15	53,6%
Sobrepeso- 26-30	7	25,0%
Obeso > 31	6	21,4%

Continua

Continuação da Tabela 1

Características Clínicas	Frequência	% (N=28)
Causa da DRC		
Hipertensão	8	28,6%
Diabetes Mellitus	13	46,4%
Outras	7	25,0%
Tipo de acesso HD		
Fistula Artériovenosa	22	78,6%
Cateter Tunelizado	5	17,9%
Cateter Duplo Lúmen	1	3,6%
Tempo de HD (meses)		
6 a 24	7	25,0%
25 a 36	9	32,1%
37 a 48	5	17,9%
Acima de 48	7	25,0%
Mín / Média ± DP / Máx	09 / 42.5 ± 26.5 / 108	
Ferro EV (mg/mês)		
0 a 299	16	57,1%
300 a 499	6	21,4%
500 a 699	6	21,4%
Mín / Média ± DP / Máx	91.6 / 311.5 ± 179.8 / 666.6	

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana e maiores e menores valores; IMC: Índice de massa corpórea; Kg: Quilogramas; M: metros; DRC: Doença renal crônica; HAS: Hipertensão arterial sistêmica; DM: Diabetes melitus; DRPAD: Doença renal policística autossômica e dominante; HD: Hemodiálise; FAV: fistula arteriovenosa; KT/V: depuração de ureia do dialisador (k), tempo de tratamento (t); volume de distribuição de ureia (v);

A Tabela 2 descreve os resultados da análise laboratorial.

Considerando-se os valores de Hb preconizados pelo KDIGO(2) (9,0-11,5 g/dL) três pacientes tinham Hb menor que 9,0 g/dL e 14 acima de 11,5 g/dL. Ao analisarmos os níveis de ferritina observamos que 12 pacientes tinham valores acima de 1500 ng/mL, 16 entre 1000 e 1500 ng/mL, além de uma média da saturação de transferrina de 47,9%, com apenas 6 pacientes apresentando níveis menores que 30%.

Tabela 2. Características laboratoriais

Exames laboratoriais	Média	± DP	VR
HB (g/dL)	11,650	± 1.96	10,0-12,0
HT (mg/dL)	37,357	± 6.31	30-36
Ferro (ug/dl)	111,500	± 49.02	65-175
Sat Fe (%)	47,929	± 20.80	> 30
Ferritina (ng/ml)	1611,714	± 599.31	30-400
Cálcio total (mg/dL)	9,500	± 0,5	8,5-10,5
Cálcio iônico (mmol/dL)	4,900	± 0,2	4,49-5,29
Fósforo (mg/dL)	5,157	± 1.59	2,5-5,5
FA (U/L)	199,500	± 220.66	40-129
PTH (pg/mL)	589,714	± 809.57	15-65
Vitamina D (ng/ml)	25,157	± 11.40	> 30
PCR (mg/dL)	7,382	± 6.74	< 5
Kt/V	1,48	± 0,3	>1,2

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana e maiores e menores valores; Mg/dl: miligramas por decilitro; mmol/dl: milimol por decilitro; FA: fosfatase alcalina (U/L); PTH: paratormônio; mcg/ml: micrograma por mililitro; PCR: proteína C reativa (mg/dl).

Avaliando os níveis de Ca, P, PTH e 25(OH) vitamina D, detectamos que um paciente apresentava hipercalcemia, 8 hiperfosfatemia e 1 hipofosfatemia. Já para os níveis do PTH evidenciamos 16 pacientes com níveis séricos menores que 300 pg/mL, quatro com valores entre 301-600 pg/mL e nos oito restantes os níveis séricos do hormônio eram superiores a 600 pg/mL. Em relação a 25 (OH) vitamina D, seis pacientes possuíam valores acima de 30 ng/mL, 17 entre 15 e 30 e ng/mL e em cinco pacientes os níveis eram menores que 15 ng/mL.

Os níveis séricos de PCR estavam elevados em 14 pacientes (quatro deles usavam cateter). Quanto à adequação da diálise dois pacientes tinham Kt/V abaixo do recomendado, ambos tinham aumento do PCR e dialisavam por cateter.

4.2 Densitometria óssea

Os resultados de DXA encontram-se na Tabela 3. A DMO era normal em 11 pacientes (T score > -1,0) e em 17 estava diminuída (osteopenia em nove e osteoporose em oito). A média do T score na coluna lombar (L1-L4) foi de $-0,746 \pm 1.626$ no quadril total de $-0,793 \pm 1.013$ e no colo do fêmur Direito de $-1,325 \pm 1.033$.

Tabela 3. Resultados da densitometria óssea.

Densitometria óssea	Média	± DP
L1- L4 (BMD) g/cm ²	0,990	± 0.184
T score L1- L4	-0,746	± 1.626
Colo do fêmur D (DMO) g/cm ²	0,728	± 0.128
T score Colo do fêmur D	-1,325	± 1.033
Quadril total D (DMO) g/cm ²	0,889	± 0.151
T score quadril total D	-0,793	± 1.013

D: Direito; DMO: Densidade Mineral e óssea; g/cm²: grama por centímetro quadrado.

A Tabela 4 descreve os resultados da RNM no fígado, medula óssea (coluna lombar) e cristas ilíacas.

Na avaliação hepática, observamos que todos os pacientes possuíam sobrecarga de ferro, com médias de T2* 6,92 ms, R2* 174,4 Hz e LIC 4,43 mg/g. Além disso, calculamos o valor de relaxamento R2* Water com média de 161,5 Hz e R2* Fat de 299,2 Hz, visando corrigir a influência da gordura nos valores de R2*. Realizamos também a avaliação dos valores de R2* Water, R2* e R2* Fat nas cristas ilíacas, locais de armazenamento fisiológico de ferro. Observamos valores semelhantes entre a coluna lombar e as cristas ilíacas.

Tabela 4. Avaliação pela RNM de fígado, cristas ilíacas e medula óssea lombar.

Ressonância Magnética	Média	± DP	VR
Fígado			
T2* (ms)	6,920	± 3,02	> 15,4
R2* (Hz)	174,436	± 80,76	< 65
LIC (mg/g)	4,434	±2,27	< 2,0
R2* Water (Hz)	161,504	± 68,84	
R2* Fat (Hz)	299,221	± 237,34	
Medula Óssea Coluna Lombar			
R2* Water (Hz)	168,361	± 44,19	
R2* (Hz)	107,879	± 32,09	
R2* Fat (Hz)	90,196	± 67,44	
Crista Ilíaca Direita			
R2* Water (Hz)	161,061	± 47,39	
R2* (Hz)	115,614	± 24,66	
R2* Fat (Hz)	82,793	± 23,94	
Crista ilíaca Esquerda			
R2* Water (Hz)	159,611	± 46,79	
R2* (Hz)	115,514	± 27,59	
R2* Fat (Hz)	81,129	± 28,51	

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana (maiores e menores valores); RNM: Ressonância Nuclear Magnética; ms: milissegundos; Hz: Hertz; mg/g: miligrama/grama; LIC: Concentração hepática de ferro; VR: (57,58,62)

Na Tabela 5 descrevemos a avaliação dos resultados da RNM no coração. Não observamos sobrecarga de Fe em nenhum dos pacientes com T2* médio de 48,3 ms. Quanto à análise funcional os resultados mostraram que 8 pacientes apresentavam uma fração de ejeção menor que o valor de referência, 21 tinham aumento do átrio esquerdo e 27 da espessura da parede lateral de VE.

Tabela 5. Avaliação cardíaca pela RNM.

RM Coração	Média	± DP	VR
Volume de AE Índice (mL/m ²)	48,000	± 19.11	Até 34
Fe VE (%)	55,679	± 13.43	> 50
FE VD (%)	60,571	± 10.83	58 ± 6,5
Volume de VD Índice (mL/m ²)	79,429	± 26.07	> 32 (H); > 27 (M)
Massa de VE Índice g/m ²	72,589	± 27.33	Até 110
Espessura parede lateral VE (cm)	0,775	± 0.21	Até 0,44
VDFi VE (mL/m ²)	101,214	± 32.09	(H) 54 ± 10; (M) 45 ± 8
VSi VE (mL/m ²)	48,143	± 27.86	(H) 21 ± 5; (M) 16 ± 4
T2* Miocárdio Basal (ms)	43,894	± 13.42	> 20
T2* Miocárdio Medial (ms)	56,134	± 58.81	> 20
T2* Miocárdio Apical (ms)	45,121	± 32.06	> 20
T2* Média Aritmética (ms)	48,383	± 25.99	> 20

Valores expressos como média e desvio padrão ou mediana (maiores e menores valores); RNM: Ressonância Nuclear Magnética; FE: fração de ejeção; VE: Ventrículo Esquerdo; VD: Ventrículo Direito; VSi: Volume sistólico final; VDFi : Volume diastólico final ms: milissegundos; Hz: Hertz; mL/m²: mililitro por metro quadrado; g/m²: grama por metro quadrado; VR: (72,79)

A Tabela 6 e a Figura 7 descrevem as correlações entre os níveis de ferritina e da saturação da transferrina com os parâmetros bioquímicos, da RNM hepática, cardíaca e das cristas ilíacas e também com os resultados da densitometria óssea.

Encontramos correlações entre os níveis de ferritina e os parâmetros da RNM do fígado, T2* basal do coração e R2* Water das cristas ilíacas.

Tabela 6. Correlações da ferritina e saturação de transferrina com os parâmetros bioquímicos RNM do fígado, coração, densitometria óssea e RNM da crista ilíaca direita e esquerda.

	Ferritina		Saturação de Transferrina	
	p	r	p	r
Parâmetros Bioquímicos				
PTH	0,7693	-0,058	0,4115	0,162
FA	0,1212	-0,229	0,7639	-0,059
PCR	0,3273	-0,192	0,3755	-0,173
RNM Fígado				
T2*	< 0.0001*	-0,671	0,4101	-0,162
R2*	< 0.0001*	0,73	0,1515	0,278
R2* Water	< 0.0001*	0,728	0,1699	0,267
RNM Coração				
T2* média global	0,1314	-0,292	0,3508	0,183
RNM Crista ilíaca D				
R2*	0,4035	0,164	0,4378	0,153
R2* Water	0,0029*	0,541	0,3349	0,189
RNM Crista Ilíaca E				
R2*	0,373	0,175	0,5684	0,113
R2* Water	0,0004*	0,622	0,7002	0,0076
DXA				
T score L1-L4	0,789	-0,055	0,5585	-0,116
T score quadril T	0,8228	-0,044	0,9131	0,0216

PTH: Paratormônio, FA: fosfatase alcalina; PCR: Proteína C reativa; T2*: Tempo de relaxamento transversal; R2*: 1/T2*; RNM: Ressonância nuclear magnética; DXA: Densitometria óssea

Figura 7. Correlações da ferritina com T2*, R2* e R2* Water do fígado e R2* da crista Ilíaca Direita e Esquerda. Continua

Figura 7. Correlações da ferritina com T2*, R2* e R2* Water do fígado e R2* da crista Ilíaca Direita e Esquerda.

Como não dispomos de valores de referência para a concentração de Fe nas cristas ilíacas obtidos na RNM decidimos avaliar se os índices no fígado, em que 100% dos pacientes apresentavam sobrecarga de Fe, se correlacionavam com os valores encontrados nas cristas ilíacas. Observamos correlações significativas entre os índices hepáticos com o R2 e R2* das cristas ilíacas. O mesmo foi detectado com os valores encontrados na coluna lombar (Tabela 7).

Tabela 7. Correlações entre os resultados da RNM do fígado e cristas ilíacas.

	T2* Fígado		R2* fígado		R2 * Water fígado	
	p	r	p	r	p	r
R2* CID	0,327	-0,4045	0,0283	0,4144	0,0156	0,4523
R2*Water CID	0,0028	-0,5457	< 0,0001	0,67	0,0001	0,6676
R2* CIE	0,0371	-0,3956	0,0279	0,4135	0,0183	0,4425
R2* Water CIE	0,0112	-0,4719	0,004	0,5257	0,0072	0,4965

Cid: Crista ilíaca direita; Cie: crista ilíaca esquerda

4.3. Avaliação da biópsia óssea

Após a análise histomorfométrica os resultados foram divididos de acordo com a classificação TMV (Tabela 8).

Quanto à remodelação, 22 pacientes (78,6%) foram classificados como baixa; em 19 pacientes a mineralização era anormal e 10 apresentavam volume ósseo diminuído.

Observamos depósitos de Fe na medula óssea de todos os pacientes (>20%)

TABELA 8. Classificação TMV.

Classificação T M V	Frequência	% (N=28)
T (remodelação)		
Alta	6	21,4%
Baixa	22	78,6%
M (mineralização)		
Normal	9	32,1%
Anormal	19	67,9%
V (volume)		
Normal	18	64,3%
Diminuído	10	35,7%

A partir da classificação TMV comparamos os resultados das análises bioquímicas e das ressonâncias de acordo com cada um dos itens que compõem o TMV ou seja: com a remodelação, a mineralização e o volume. Os resultados estão expressos nas tabelas 9, 10 e 11.

Pacientes com baixa remodelação óssea apresentam níveis séricos de Fe mais altos em comparação com elevada remodelação (120,5 x 78,3; $p= 0.03$) e os valores de $R2^*$ e $R2^*$ Fat das cristas ilíacas são menores quando comparados aos com alta remodelação

TABELA 9. Comparação dos resultados bioquímicos e da RNM dos pacientes divididos quando ao tipo de remodelação óssea

Exames laboratoriais	T - ALTA (n=6)		T - BAIXA (n=22)		p-valor
	Média	± DP	Média	± DP	
HB	12,117	± 1,90	11,523	± 2,00	0,2607
HT	40,433	± 6,64	36,518	± 6,11	0,0915
Ferro	78,333	± 35,72	120,546	± 48,84	0,0300*
Sat Fe	44,183	± 22,69	48,950	± 20,71	0,3139
Ferritina	1772,500	± 621,65	1567,864	± 600,32	0,2344
Cálcio total	9,75	±0,31	9,50	±0,64	0,0939
Cálcio iônico	4,97	±0,24	4,95	±0,31	0,4377
Fósforo	5,117	± 2,33	5,168	± 1,39	0,4727
FA	278,167	± 379,29	178,046	± 161,56	0,2778
PTH	637,833	± 814,64	417,090	± 361,05	0,4366
Vitamina D	22,467	± 6,06	25,891	± 12,48	0,1797
PCR	6,833	± 5,12	7,532	± 7,21	0,4134
RNM	T - ALTA (n=6)		T - BAIXA (n=22)		p-valor
	Média	± DP	Média	± DP	
Crista Ilíaca Direita					
R2* Water	178,983	± 13,58	156,173	± 10,68	0,1524
R2*	138,967	± 8,60	109,246	± 4,66	0,0031*
R2* Fat	105,433	± 3,66	76,618	± 4,91	<0,0001*
Crista Ilíaca Esquerda					
R2* Water	175,867	± 10,11	155,177	± 10,82	0,0901
R2*	141,867	± 8,72	108,327	± 5,30	0,0029*
R2* Fat	109,417	± 11,75	73,414	± 5,03	0,0019*

*Teste t-Student independente

As correlações entre o tipo de remodelação óssea e os parâmetros bioquímicos e da RNM revelaram uma associação com o Fe sérico ($r_s = 0,4095$; $p = 0,00304$). Quanto a RNM observamos uma correlação direta com o R2* Fat do fígado ($r_s = 0,4633$; $p = 0,0130$), além do R2* e R2* Fat da crista ilíaca direita (R2*: $r_s = 0,4849$;

$p= 0,0089$; $R2^*$ Fat: $rs - 0,5711$; $p= 0,0015$) e esquerda ($R2^*$: $rs - 0,5011$; $p= 0,0066$; $R2^*$ Fat: $rs - 0,4580$; $p= 0,0142$)

Na Tabela 10 descrevemos as comparações bioquímicas e de RNM entre os pacientes com mineralização óssea normal e anormal. Os níveis séricos de P ($4,611 \times 6,311$; $p= 0,0028$), PTH ($305,8 \times 527,5$; $p= 0,0534$) e do PCR ($12,711 \times 4,858$; $p= 0,0104$) foram menores nos pacientes com mineralização anormal.

Em relação com a RNM observamos um aumento no $R2^*$ Fat nas duas cristas ilíacas de pacientes com mineralização óssea normal.

TABELA 10. Comparação dos resultados bioquímicos e de RNM entre os pacientes com mineralização óssea normal e anormal.

Exames laboratoriais	M - NORMAL (n=9)		M - ANORMAL (n=19)		p-valor
	Média	± DP	Média	± DP	
HB	11,867	± 2.18	11,547	± 1,91	0,3478
HT	38,078	± 6.43	37,016	± 6,41	0,3429
Ferro	95,556	± 34.78	119,053	± 53,66	0,1216
Sat Fe	43,711	± 18.53	49,926	± 21,99	0,2353
Ferritina	1444,889	± 444.33	1690,737	± 656,13	0,1599
Cálcio Iônico	5,00	±0,23	4,931	±0,32	0,2922
Cálcio Total	9,511	±0,58	9,568	±0,61	0,4076
Fósforo	6,311	± 1.44	4,611	± 1,39	0.0028*
FA	229,250	± 245.39	128,556	± 46,41	0,1436
PTH	527,571	± 373.65	305,889	± 267,47	0,0534*
Vitamina D	27,633	± 13.12	23,984	± 10,68	0,2197
PCR	12,711	± 8.09	4,858	± 4,26	0.0104*
RNM	M - NORMAL (n=9)		M - ANORMAL (n=19)		p-valor
	Média	± DP	Média	± DP	
Crista Iliaca Direita					
R2* Water	150,788	± 33,61	165,170	± 52.09	0,2393
R2*	120,513	± 21,64	113,655	± 26.03	0,2582
R2* Fat	99,263	± 15,47	76,205	± 23.80	0.0091*
Crista Iliaca Esquerda					
R2* Water	149,338	± 25,99	163,720	± 52.92	0,1733
R2*	121,825	± 20,74	112,990	± 30.00	0,2272
R2* Fat	97,625	± 25.15	74,530	± 27.60	0.0254*

*Teste t-Student independente

Com relação às associações detectamos correlações inversas entre a mineralização anormal e os níveis séricos de P ($r_s = -0.4835$; $p = 0,009$) de PTH ($r_s = -0.3929$; $p = 0,0385$) e do PCR ($r_s = -0.5115$; $p = 0,0054$). Para o PCR e mineralização

anormal realizamos o modelo de regressão logística múltipla com $p = 0,044$ e Odds Ratio (IC 95%) = 0,8142 (0,67 – 0,99).

Na Tabela 11 descrevemos a comparação entre os resultados das análises bioquímicas e de ressonância nos pacientes quando comparamos aqueles com volume ósseo normal e reduzidos e detectamos níveis séricos menores de Cai ($5,042 \times 4,77$; $p = 0,0114$) e de PTH ($757,2 \times 288,1$; $p = 0,0309$) nos pacientes com diminuição do volume ósseo. Em relação a RNM observamos diminuição do R2* Fat em ambas as cristas ilíacas dos pacientes com diminuição do volume ósseo quando comparados aos com volume ósseo normal.

TABELA 11. Comparação do laboratório e de RNM dos pacientes com volume ósseo normal e baixo.

Exames laboratoriais	V - NORMAL (n=18)		V - DIMINUÍDO (n=10)		p-valor
	Média	± DP	Média	± DP	
HB	11,633	± 1,97	11,68	± 2,051	0,4766
HT	37,722	± 6,46	36,70	± 6,325	0,3447
Ferro	110,333	± 49,58	113,60	± 50,57	0,4348
Sat Fe	51,000	± 21,03	42,40	± 20,26	0,1516
Ferritina	1584,722	± 528,12	1660,30	± 739,34	0,3779
Cálcio Iônico	5,042	±0,26	4,77	±0,29	0,0114*
Cálcio total	9,633	±0,46	9,40	±0,78	0,1622
Fósforo	5,244	± 1,69	5,00	± 1,44	0,3518
FA	238,889	± 268,37	132,20	± 46,96	0,0622
PTH	757,278	± 968,15	288,10	± 196,20	0,0309*
Vitamina D	26,556	± 9,72	22,64	± 14,17	0,1971
PCR	6,456	± 6,73	9,05	± 6,785	0,1692
RNM	V - NORMAL (n=18)		V - DIMINUÍDO (n=10)		p-valor
Fígado	Média	± DP	Média	± DP	
Crista Ilíaca Direita					
R2* Water	154,106	± 31,76	173,580	± 67,53	0,2039
R2*	122,039	± 20,56	104,050	± 28,18	0.0315*
R2* Fat	93,144	± 26,38	64,160	± 24,75	0.0005*
Crista Ilíaca Esquerda					
R2* Water	151,561	± 28,61	174,100	± 68,26	0,1712
R2*	120,550	± 22,90	106,450	± 33,93	0,1003
R2* Fat	89,183	± 24,30	66,630	± 30,98	0.0212*

*Teste t-Student independente

Quanto às correlações, os níveis séricos de Cai se associaram negativamente com o volume ósseo assim como os índices da RNM de ambas as cristas ilíacas. (rs -0,3936; p= 0,0421), e com o R2* e R2* Fat de crista ilíaca direita (R2*: rs -0.3783; p= 0,0471; R2* Fat: rs -0.5998; p= 0,0007).

5 DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O principal achado do nosso estudo é que pacientes relativamente jovens em HD com ferritina sérica elevada apresentam sobrecarga de Fe no fígado, crista ilíaca direita e esquerda e coluna lombar e não no coração.

Outro resultado que merece destaque é que na avaliação de sobrecarga de ferro pela RNM das cristas ilíacas os resultados se associaram com os achados do fígado. Além disso na interpretação das imagens da RNM se excluiu a gordura fator que interfere na avaliação dos depósitos de Fe tornando os resultados mais fidedignos. Esse é o primeiro estudo que utilizou essa associação entre cristas ilíacas e fígado pela RNM e a correção da gordura para avaliar depósitos de Fe em pacientes com DRC.

A sobrecarga de Fe era muito prevalente nos pacientes com DRC, antes da introdução da EPO, pois recebiam transfusões sanguíneas frequentes para correção da anemia.

Em 2012 Rostoker e cols. (80), avaliaram a RNM de pacientes em HD tratados com EPO e suplementação regular de Fe EV, conforme diretrizes vigentes e demonstraram sobrecarga de Fe de leve a moderada intensidade alertando para a necessidade de uma monitorização mais precisa para a suplementação de Fe nesses pacientes. Em estudo posterior que pacientes com níveis de ferritina superiores a 290 mg / L tinham uma concentração de Fe no fígado superior a 200 mg / g, sugerindo que a suplementação de Fe não devia exceder 250 mg/mês (81), alertando para a necessidade de uma monitorização mais precisa para a suplementação de Fe nesses pacientes. Entretanto, as orientações do KDIGO continuam propondo níveis de ferritina de 500 mg/L e a saturação da transferrina até 30%.

Nossos resultados mostraram que os pacientes tinham níveis de Hb adequados porém os valores de ferritina e saturação de transferrina estavam muito elevadas. Cerca de 50% deles apresentavam níveis de PCR elevados e sabe-se que ferritina pode sofrer variações em estados inflamatórios instituindo-se um fator de confusão, que dificulta a reposição adequada de Fe. (40,82)

Empregando RNM, nosso estudo avaliou a sobrecarga de Fe em quatro locais do organismo, fígado crista ilíaca, coluna lombar e coração.

A RNM do fígado é considerada o melhor método não invasivo para quantificar o nível de Fe hepático. Essa técnica tem boa sensibilidade e especificidade tanto no diagnóstico como no seguimento do tratamento com quelantes de Fe. (83-86)

Todos os pacientes apresentavam sobrecarga de Fe no fígado e os valores encontrados se correlacionaram com a ferritina sérica, o que já foi demonstrado em outros trabalhos (4,17,77,85). Nesse estudo os autores avaliaram pacientes com ferritina elevada porém sem sinais de inflamação e desnutrição, ao contrário dos nossos onde a inflamação estava presente em 50% dos pacientes e mesmo assim os níveis de ferritina se correlacionaram com a sobrecarga no fígado. (87)

Estudo recente avaliou 68 pacientes em HD empregando RNM e os resultados mostraram que 57,4% dos pacientes apresentavam diferentes graus de sobrecarga além do papel da mesma no desenvolvimento de esteatose hepática. Esse estudo abre novas perspectivas para a compreensão tanto da sobrecarga como da sua importância na síndrome metabólica frequentemente presente nos pacientes com DRC (88, 89).

Quanto ao coração o primeiro estudo que empregou RNM para avaliar sobrecarga de Fe nesse órgão data de 2001 e foi realizado em pacientes talassêmicos. As complicações cardíacas são responsáveis por cerca de 50% das mortes nesses pacientes e após o uso da RNM como método diagnóstico ocorreu uma redução significativa dessas mortes, pois o diagnóstico mais preciso levou a uma intensificação dos esquemas de quelação do Fe com melhora da sobrevida. (90,91)

Os estudos que utilizaram a RNM para avaliar sobrecarga de Fe no coração de pacientes com DRC em HD e como o nosso não detectou depósitos desse elemento. Aparentemente a deposição do Fe no fígado e no coração são distintas e começam a ser melhor compreendidas. Sabe-se que a cinética de depósito Fe no coração é mais lenta que a do fígado, provavelmente sendo necessário um tempo bem maior de exposição ao Fe para que haja impregnação do tecido cardíaco. (91,92,93)

As alterações funcionais encontradas do coração dos pacientes estudados, detectadas na RNM provavelmente se devem a etiologia da DRC, pois 50% deles

eram hipertensos ou diabéticos e além disso, e a própria DRC leva a complicações cardiovasculares ao longo da sua evolução. No entanto, vale ressaltar que o excesso de Fe aumentam os níveis de hepcidina que por sua vez ativam macrófagos em placas ateromatosas favorecendo sua ruptura. Desta forma, o excesso de Fe, em longo prazo e sem correção, contribuiria para as complicações cardiovasculares desses pacientes. (12,94,95)

Diante da sobrecarga de Fe o fígado e a medula óssea são os primeiros órgãos a serem afetados. Na avaliação da biópsia óssea, evidenciamos que todos os pacientes possuíam sobrecarga de ferro na medula. Rocha et al (96) descreveram um método quantitativo para a contagem de células coradas com o ferro na medula óssea de paciente em HD e observaram um aumento de células em pacientes com níveis de ferritina acima de 500 ng/mL.

Até o presente momento esse é o primeiro estudo que avaliou depósitos de Fe nas cristas ilíacas empregando RNM. Apesar da falta de valores de referência para essa região encontramos correlações significativas entre os valores de Fe do fígado com a coluna lombar e a crista ilíaca sugerindo que a crista ilíaca também poderia refletir o excesso de Fe no organismo. Outro resultado interessante é que os níveis séricos de ferritina se correlacionaram com os valores de T2*, R2* e R2* Water no fígado e com R2* water nas cristas ilíacas demonstrando que os níveis elevados dessa proteína sugerem a presença de Fe em excesso nesses órgãos. A não correlação da ferritina com o R2* pode ser explicado pela presença de grande quantidade de gordura na região analisada, assim a não separação entre o Fe e a gordura, na análise do R2*, pode subestimar, a sobrecarga de Fe. Esse método já foi validado em pacientes com doenças que cursam com sobrecarga de Fe mas é a primeira vez que foi empregada em pacientes com DRC. (97,98,99).

O perfil bioquímico dos distúrbios do metabolismo mineral (níveis séricos de Ca; P; PTH e vitamina D) nos pacientes estudados não difere do observado em outros pacientes com DRC e aparentemente não foi afetado pelas alterações do metabolismo do Fe.

Pacientes com diferentes etiologias para sobrecarga de Fe apresentam distúrbios do metabolismo mineral, da DMO e da remodelação óssea. Poucos

evoluem para DRC estagio 5 em diálise o que impede comparação com nossos pacientes.

Nos últimos anos a descoberta de quelantes de P a base de Fe tem sido proposta como uma alternativa promissora para, ao mesmo tempo ofertar Fe e quelar o P. Porém ainda não existem estudos com avaliação a longo prazo se a oferta de Fe levaria a sobrecarga e qual seria o efeito nos distúrbios do metabolismo mineral. (100-102)

O aumento do Fe sérico nos pacientes com baixa remodelação óssea é um achado interessante, que o Fe pode diminuir a atividade dos osteoblastos Estudos com linhagem celular de osteoblastos de origem fetal humana imortalizados (hFOB1.19) demonstraram que o Fe aumenta as espécies reativas de oxigênio, diminuem a atividade da FA e a mineralização óssea o que pode ter contribuído para a diminuição da remodelação observada nos nossos pacientes. Outros estudos também demonstraram os efeitos do Fe diminuindo a expressão da osteocalcina e do RUNX2 (runt related trascription factor 2) com efeitos na formação óssea. (103-109)

Encontramos uma associação entre aumento dos níveis de PCR e mineralização normal (110,111). Níveis elevados de ferritina e PCR se associaram com diminuição da DMO em mulheres na pré- menopausa além de aumento no risco de fraturas (112) Estudos in vitro demonstraram que o PCR inibe a diferenciação tanto de osteoblastos como de osteoclastos (111) porém não avaliaram a mineralização. Entretanto nossos achados precisam ser mais bem elucidados.

Os resultados da DXA revelaram que 60 % dos pacientes tinha osteopenia/osteoporose achado semelhante a estudo recém-publicado que avaliou a DMO de 1172 pacientes a maioria em HD (113) e viram que a DMO estava reduzida no colo de fêmur semelhante ao que encontramos. Entretanto, não sabemos o exato papel do Fe na redução da DMO, visto que não quantificamos os depósitos desse metal na medula óssea

Quanto a análise histomorfométrica da biópsia óssea encontramos que a remodelação a mineralização estavam comprometidas na maioria dos pacientes e o volume ósseo diminuído em 35% deles. Esses achados são observados em coortes de pacientes com DRC submetidos à biopsia óssea e aparentemente não foram influenciados por sobrecarga de Fe. (113,114,115)

Nos pacientes talassémicos, o excesso de Fe no intestino diminui a absorção intestinal de Ca. A presença de fosfatúria é frequente assim como diminuição dos níveis séricos de 25 (OH) vitamina D. Esse conjunto de alterações provavelmente contribui para as lesões ósseas detectadas nesses pacientes que não podem ser extrapoladas para os pacientes com DRC (116-118).

Estudos prospectivos incluindo pacientes com DRC e sobrecarga de Fe, tratados com quelantes de Fe e com biopsia óssea antes e após o tratamento poderiam esclarecer o papel do Fe nas alterações ósseas observadas.

6 CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

Em conclusão esse estudo demonstrou que pacientes com DRC com níveis elevados de ferritina apresentavam sobrecarga de Fe no fígado, na crista ilíaca e não no coração.

Não podemos concluir que essa sobrecarga afetou a densidade mineral óssea. No entanto, os níveis de Fe sérico se associaram com diminuição da remodelação óssea.

Encontramos uma associação entre a sobrecarga de Fe no fígado e na crista ilíaca que não foi relatada na literatura e que precisaria ser melhor avaliada em estudos futuros.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Crews DC, Bello AK, Saadi G. Editorial do Dia Mundial do Rim 2019 - impacto, acesso e disparidades na doença renal. J. Bras. Nefrol., São Paulo, v. 41, n. 1, p. 1-9, Mar. 2019.
2. Cançado RD. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. Rev Bras Hematol Hemoter. São José do Rio Preto. 2007;29(3):316- 26.
3. Babiit JI, Lin HY. Molecular Mechanisms of Hepcidin Regulation: Implications for the Anemia of CKD Am J Kidney Dis. 2010;55(4):726–41.
4. Gaweda AE, Ginzburg YZ, Chait Y, Germain MJ , Aronoff GR, Rachmilewitz E Iron dosing in kidney disease: inconsistency of evidence and clinical practice . Nephrol Dial Transplant 2015;30:187-96.
5. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Cohen Y. Iatrogenic Iron Overload in Dialysis Patients Updates in Hemodialysis 2015.
6. Saliba AN, Harb AR, Taher AT. Iron chelation therapy in transfusion-dependent thalassemia patients: current strategies and future directions. J Blood Med. 2015.
7. Grotto HZW. Fisiologia e metabolismo do ferro. Rev Bras Hematol Hemoter 2010;32:8-17.
8. Munareto KA, Frizzo MN. Hepcidina como regulador da homeostase do ferro: uma revisão. Pós-graduação. Unijuí, 2015.
9. Morabito N, Russo GT, Gaudio A, Lasco A, Catalano A, Morini E, Franchina F, Maisano D, La Rosa M, Plota M, Crifo A, Meo A, Frisina N (2007) The “lively” cytokines network in beta- thalassemia major-related osteoporosis. Bone 200740(6):1588-94.
10. Eknoyan G, Lameire N, Eckardt KU, et al. KDIGO Clinical practice guideline for anemia in chronic kidney disease. Kidney Int Suppl. 2012;2:279-335.
11. Locatelli F, Covic A, Eckardt KU, Wiecek A, Vanholder R. On behalf of the ERA-EDTA ERBP advisory board. Anaemia management in patients with chronic kidney disease: a position statement by the Anaemia Working Group of European Renal Best Practice (ERBP). Nephrol Dial Transplant. 2009;24(2):348-54
12. Bailie, George R. Larkina, Maria Goodkin, David A. Li, Yun Pisoni, Ronald L. Bieber, Brian Mason, Nancy Tong, Lin Locatelli, Francesco Marshall, Mark R. Inaba, Masaaki Robinson, Bruce M. Data from The dialysis outcomes and practice patterns study validate an association between high intravenous iron doses and mortality Kidney International 2014.
13. Esposito BP, Breuer W, Sirankapracha P, et al. Labile plasma iron in iron overload:Redox activity and susceptibility to chelation. Blood. 2003;102:2670-7.
14. Pietrangelo A. Metals, oxidative stress, and hepatic fibrogenesis. Semin Liver Dis. 1996;16:13-30

15. Fishbane S, Mathew A, Vaziri ND. Iron toxicity: relevance for dialysis patients *Nephrol Dial Transplant*. 2014;(29):255-9.
16. Rostoker G, Vaziri ND, Fishbane S. Iatrogenic Iron Overload in Dialysis Patients at the Beginning of the 21st Century *Drugs*. 2016;76(7):741-57.
17. Wood JC, Tyszka TM, Ghugre N, et al. Myocardial iron loading in transfusion-dependent thalassemia and sickle-cell disease. *Blood*. 2004;103:1934-6.
18. Wood, John C. Enriquez, Cathleen Ghugre, Nilesh Otto-Duessel, Maya Aguilar, Michelle Nelson, Marvin D. Moats, Rex Coates, Thomas D. Physiology and pathophysiology of iron cardiomyopathy in thalassemia *Ann N Y Acad Sci*. 2005; 1054:386-95.
19. Templeton DM, Liu Y. Genetic regulation of cell function in response to iron overload or chelation. *Biochim. Biophys. Acta*. 2003;1619:113-24.
20. Li W, Coates T, Wood JC. Atrial dysfunction as a marker of iron cardiotoxicity in thalassemia major *Haematologica*. 2008;93(2):311-2.
21. Link G, Athias P, Grynberg A, et al. Effect of iron loading on transmembrane potential, contraction, and automaticity of rat ventricular muscle cells in culture. *J Lab Clin Med*. 1989;113:103–11.
22. Laurita KR, Chuck ET, Yang T, et al. Optical mapping reveals conduction slowing and impulse block in iron-overload cardiomyopathy. *J Lab Clin Med*. 2003;142:83-9.
23. He, YF, Ma, Y, Gao, C et al. Iron Overload Inhibits Osteoblast Biological Activity Through Oxidative Stress. *Biol Trace Elem Res*. 2013;152:292.
24. Winkelmayer WC, Mitani AA, Goldstein BA, Brookhart MA, Chertow GM. Trends in Anemia Care in Older Patients Approaching End-Stage Renal Disease in the United States (1995-2010) *JAMA Intern Med*. 2014;174(5):699-707.
25. Voskaridou E, Terpos E. Pathogenesis and management of osteoporosis in thalassemia. *Pediatr Endocrinol Rev*. 2008;6 Suppl 1:86-93.
26. He, YF, Ma, Y, Gao, C et al. Iron Overload Inhibits Osteoblast Biological Activity Through Oxidative Stress *Biol Trace Elem Res*. 2013;152:292.
27. Gomes SA, dos Reis LM, de Oliveira IB, Noronha IL, Jorgetti V, Heilberg IP. Usefulness of a quick decalcification of bone sections embedded in methyl methacrylate[corrected]: an improved method for immunohistochemistry. *J Bone Mineral Metab*. 2008;26(1):110-13.
28. Yang K, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory Effects of Iron on Bone Morphogenetic Protein 2–Induced Osteoblastogenesis *J Bone Mineral Research*, 2011;26(6):1188–96.
29. Balogh, E., Tolnai, E., Nagy, B. Jr., Nagy, B., Balla, G., Balla, J., et al. (2016). Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1862:1640–9.

30. Almeida A, Roberts I. Bone involvement in sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2005;129:482-90.
31. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Antal-Szalmas P, Agarwal A et al. Ferritin prevents calcification and osteoblastic differentiation of vascular smooth muscle cells. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:1254-63.
32. Bordat C, Constans A, Bouet O, Blanc I, Trubert CL, Girot R et al. Iron distribution in thalassemic bone by energy-loss spectroscopy and electron spectroscopic imaging. *Calcif Tissue Int.* 1993;53:29–37.
33. Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapradang A et al. Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88:3966-72.
34. Almeida M, Han L, Martin-Millan M, O'Brien CA, Manolagas SC Oxidative stress antagonizes Wnt signaling in osteoblast precursors by diverting beta-catenin from T cell factor to forkhead box O-mediated transcription. *J Biol Chem* 2007;282(37):27298–305.
35. Roodman GD. Osteoclasts pump iron. *Cell Metab.* 2009;9:405-6.
36. Ishii KA, Fumoto T, Iwai K, Takeshita S, Ito M, Shimohata N et al. Coordination of PGC-1 β and iron uptake in mitochondrial biogenesis and osteoclast activation. *Nat. Med.* 2009;15:259-66.
37. Jia P, Xu YJ, Zhang ZL, Li K, Li B, Zhang W et al. Ferric ion could facilitate osteoclast differentiation and bone resorption through the production of reactive oxygen species. *J Orthop Res.* 2012;30:1843-52.
38. Tsay J, Yang Z, Ross FP, Cunningham-Rundles S, Lin H, Coleman R, Mayer-Kuckuk P et al. Bone loss caused by iron overload in a murine model: importance of oxidative stress. *Blood.* 2010;116(14):2582-9.
39. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* 2007;117:1926-32.
40. Ferrari P, Kulkarni H, Dheda S et al. Serum iron markers are inadequate for guiding iron repletion in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011;6(1):77-83.
41. Rostoker G, Vaziri ND. Risk of iron overload with chronic indiscriminate use of intravenous iron products in ESRD and IBD populations. *Heliyon.* 2019;5(7):e02045.
42. Coyne DW, Kapoian T, Suki W, Singh AK, Moran JE, Dahl NV, Rizkala AR, The DRIVE Study Group Ferric Gluconate Is Highly Efficacious in Anaemic Haemodialysis Patients with High Serum Ferritin and Low Transferrin Saturation: Results of the Dialysis Patients Response to IV Iron with Elevated Ferritin (DRIVE) Study. *J Am Soc Nephrol.* 2007;18(3):975-84.

-
43. Hernando D, Levin YS, Sirlin CB, Reeder SB. Quantification of Liver Iron with MRI: State of the Art and Remaining Challenges. *J Magn Reson Imaging*. 2014; 40(5):1003–21.
 44. Ghugre NR, Coates TD, Nelson MD, Wood JC. Mechanisms of tissue-iron relaxivity: nuclear magnetic resonance studies of human liver biopsy specimens. *Magn Reson Med*. 2005;54:1185–93.
 45. Wood JC. Magnetic resonance imaging measurement of iron overload. *Curr Opin Hematol*. 2007;14(3):183–90.
 46. Labranche R, Gilbert G, Cerny M, Vu KN, Soulières D, Olivie D, Billiard JS et al. Liver Iron Quantification with MR Imaging: A Primer for Radiologists. *Radiographics*. 2018;38(2):392-412.
 47. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N et al. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005;106:1460–65.
 48. Wood JC, Fassler J, Meade T. Mimicking liver iron overload using liposomal ferritin preparations. *Magn Reson Med*. 2004;51(3):607-11.
 49. Echeverria JM, Castiella A, Emparanza JL. Quantification of iron concentration in the liver by MRI. *Insights Imaging*. 2012;3 (2):173- 80.
 50. Queiroz-Andrade M, Blasbalg R, Ortega CD, Rodstein MA, Baroni RH, Rocha MS, Cerri GG. MR imaging Findings of iron overload. *Radiographics*. 2009;29 (6):1575- 89.
 51. Westwood MA, Anderson LJ, Tanner MA, Pennell DJ. The relationship between myocardial iron deposition and left ventricular dysfunction in thalassemia using cardiovascular magnetic resonance. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2005;7:46-7.
 52. Anderson LJ, Holden S, Davis B, et al. Cardiovascular T2-star (T2*) magnetic resonance for the preparations. *Mag Res Med*. 2004;51:607-11.
 53. Alústiza JM, Artetxe J, Castiella A, Agirre C, Emparanza JI, et al. MR quantification of hepatic iron concentration. *Radiology*. 2004;230(2):479-84.
 54. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, et al. Hemodialysis-associated hemosiderosis in the era of erythropoiesis-stimulating agents: a MRI study. *Am J Med*. 2012;125(10):991–9.
 55. Wood JC, Ghugre N, Carson S, et al. Predictors of abnormal myocardial function and T2* in children and young adults with thalassemia major. *Blood* 2003;102:952a
 56. Tanner MA, He T, Westwood MA, Firmin DN, et al. Multi-center validation of the transferability of the magnetic resonance T2* technique for the quantification of tissue iron. *Haematologica*. 2006;91:1388–91.
 57. Henninger B. Demystifying liver iron concentration measurements with MRI. *Eur Radiol*. 2018;28(6):2535-36.

-
58. Kühn JP, Hernando D, Muñoz del Rio A, et al. Effect of multipeak spectral modeling of fat for liver iron and fat quantification: correlation of biopsy with MR imaging results. *Radiology*. 2012;265(1):133–142.
 59. Hernando D, Kramer JH, Reeder SB. Multipeak fat-corrected complex R2* relaxometry: theory, optimization, and clinical validation. *Magn Reson Med*. 2013;70(5):1319–31.
 60. Hernando D, Levin YS, Sirlin CB, Reeder SB. Quantification of liver iron with MRI: state of the art and remaining challenges. *J Magn Reson Imaging*. 2014;40(5):1003–21.
 61. Hernando D, Kühn JP, Mensel B, et al. R2* estimation using "in-phase" echoes in the presence of fat: the effects of complex spectrum of fat. *J Magn Reson Imaging*. 2013;37(3):717–26.
 62. Reeder SB, Sirlin CB. Quantification of liver fat with magnetic resonance imaging. *Magn Reson Imaging Clin N Am*. 2010;18(3):337-57.
 63. Custodio MR, Elias RM, Velasquez WD, Dos Reis LM, Oliveira IB, Moyses RMA, Carvalho AB, Jorgetti V. The unexpected presence of iron in bone biopsies of hemodialysis patients. *Int Urol Nephrol*. 2018;50(10):1907-12.
 64. De Souza CG, de Souza MP, Jorgetti V, Dos Reis LM. Histomorphometric bone assessment in patients with fracture of the proximal end of the femur. *Acta Ortop Bras*. 2015;23(2):103-6.
 65. Dempster DW, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, et al. Standardized nomenclature, symbols, and units for Bone Histomorphometry: A 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res*. 2013;28:2-17.
 66. Dos Reis LM, Batalha JR, Munoz DR, Borelli A, Correa PHS, et al. Brazilian normal static bone histomorphometry: effects of age, sex and race. *J Bone Miner Metab*. 2007;25(6):400-6.
 67. Melsen F, Mosekilde L. Tetracycline double-labelling of iliac trabecular bone in 41 normal adults. *Calcif Tissue Res*. 1978;26(2):99-102.
 68. Barreto FC, Barreto DV, Moyses RM, Neves CL, Jorgetti V, et al. Osteoporosis in hemodialysis patients revisited by bone histomorphometry: a new insight into an old problem. *Kidney Int*. 2006;69(10):1852-7.
 69. Wood JC, Enriquez C, Ghugre N, Tyzka JM, Carson S, Nelson MD, et al. MRI R2 and R2* mapping accurately estimates hepatic iron concentration in transfusion-dependent thalassemia and sickle cell disease patients. *Blood*. 2005;106(4):1460-5.
 70. Garbowski MW, Carpenter JP, Smith G, et al. Biopsy-based calibration of T2* magnetic resonance for estimation of liver iron concentration and comparison with R2 Ferriscan. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2014;16:40

71. Storey P, Thompson AA, Carqueville CL, et al. R2* imaging of transfusional iron burden at 3T and comparison with 1.5T. *J Magn Reson Imaging*. 2007;25(3):540-7.
72. Carpenter JP, He T, Kirk P, Roughton M, Anderson LJ, de Noronha SV, Sheppard MN, Porter JB, Walker JM, Wood JC, Galanello R, Forni G, Catani G, Matta G, Fucharoen S, Fleming A, House MJ, Black G, Firmin DN, St Pierre TG, Pennell DJ. On T2* magnetic resonance and cardiac iron. *Circulation*. 2011;123(14):1519-28.
73. Schulz-Menger J, Bluemke DA, Bremerich J, Flamm SD, Fogel MA, Friedrich MG, et al. Standardized image interpretation and post processing in cardiovascular magnetic resonance: Society for Cardiovascular Magnetic Resonance (SCMR) board of trustees task force on standardized post. *J Cardiovasc Magn Reson*. 2013;15:3.
74. Miller S, Simonetti OP, Carr J, Kramer U, Finn JP. MR Imaging of the heart with cine true fast imaging with steady-state precession: influence of spatial and temporal resolutions on left ventricular functional parameters. *Radiology*. 2002;223(1):263-9.
75. Drakonaki EE, Maris TG, Papadakis A, Karantanis AH. Bone marrow changes in beta-thalassemia major: quantitative MR imaging findings and correlation with iron stores. *Eur Radiol*. 2007;17:2079-87.
76. Isokawa M, Kimura F, Matsuki T, et al. Evaluation of bone marrow iron by magnetic resonance imaging. *Ann Hematol*. 1997;74(6):269-74.
77. Wahidiyat PA, Liauw F, Sekarsari D, Putriasih SA, Berdoukas V, Pennell DJ. Evaluation of cardiac and hepatic iron overload in thalassemia major patients with T2* magnetic resonance imaging. *Hematology*. 2017;22(8):501-7.
78. Papakonstantinou O, Alexopoulou E, Economopoulos N, Benekos O, Kattamis A, Kostaridou S, Ladis V, Efstathopoulos E, Gouliamos A, Kelekis NL. Assessment of iron distribution between liver, spleen, pancreas, bone marrow, and myocardium by means of R2 relaxometry with MRI in patients with beta-thalassemia major. *J Magn Reson Imaging*. 2009;29(4):853-9.
79. Lang RM, Badano LP, Mor-Avi V, Afilalo J, Armstrong A, Ernande L, Flachskampf FA, Foster E, Goldstein SA, Kuznetsova T, Lancellotti P, Muraru D, Picard MH, Rietzschel ER, Rudski L, Spencer KT, Tsang W, Voigt JU. Recommendations for cardiac chamber quantification by echocardiography in adults: an update from the American Society of Echocardiography and the European Association of Cardiovascular Imaging. *J Am Soc Echocardiogr*. 2015;28(1):1-39.
80. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Couprie R, Benmaadi A, Bounhiol C, Roy M, Machado G, Jankiewicz P, Drahi G, Dahan H, Cohen Y. Hemodialysis-associated hemosiderosis in the era of erythropoiesis-stimulating agents: a MRI study. *Am J Med*. 2012;125(10):991-9.

81. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Magna T, Jankiewicz P, et al. Maximal Standard dose of parenteral iron for hemodialysis patients: an MRI-based decision tree learning analysis. *PLoS One*. 2014;9(12):e115096
82. Coyne DN, Kapoian T, Suki W, Singh AK, Moran JE, Dahl NV, Rizkala AR, DRIVE Study Group. Ferric gluconate is highly efficacious in anemic hemodialysis patients with high serum ferritin and low transferrin saturation: results of the Dialysis Patients' Response to IV Iron with Elevated Ferritin (DRIVE) Study. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(3):975-84.
83. Holman R, Olynyk JK, Kulkarni H, Ferrari P. Characterisation of hepatic and cardiac iron deposition during standard treatment of anaemia in haemodialysis. *Nephrology*. 2017;22(2):114-7.
84. Ghoti H, Rachmilewitz EA, Simon-Lopez R, Gaber R, Katzir Z, Konen E, Kushnir T, Girelli D, Campostrini N, Fibach E, Goitein O. Evidence for tissue iron overload in long-term hemodialysis patients and the impact of withdrawing parenteral iron. *Eur J Haematol*. 2012;89(1):87-93.
85. Tolouian R, Mulla ZD, Diaz J, Aguila J, Ramos-Duran L. Liver and Cardiac Iron Deposition in Patients on Maintenance Hemodialysis by Magnetic Resonance Imaging T2. *Iran J Kidney Dis*. 2016;10:68-74.
86. Rostoker G, Griuncelli M, Loridon C, Magna T, Machado G, Drahi G, et al. Reassessment of Iron Biomarkers for Prediction of Dialysis Iron Overload: An MRI Study. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132006.
87. Ferrari P, Kulkarni H, Dheda S, et al. Serum iron markers are inadequate for guiding iron repletion in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(1):77-83.
88. De Marchi S, Cecchin E. Hepatic computed tomography for monitoring the iron status of haemodialysis patients with haemosiderosis treated with recombinant human erythropoietin. *Clin Sci (Lond)*. 1991 Jul;81(1):113-21.
89. Da Silva Martins J, Castro JH, Sainz Rueda NA, et al. Renal osteodystrophy in the obesity era: Is metabolic syndrome relevant?. *PLoS One*. 2017;12(7):e0180387.
90. Barros RK, Cotrim HP, Daltro CH, Oliveira YA. Hyperferritinemia in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Rev Assoc Med Bras*. 2017;63(3):284-9.
91. Wood JC. History and current impact of cardiac magnetic resonance imaging on the management of iron overload. *Circulation*. 2009;120(20):1937-9.
92. Dimitriadou, M., Christoforidis, A., Economou, M., Tsatra, I., Vlachaki, E., Fidani, L, Athanassiou-Metaxa, M. Elevated serum parathormone levels are associated with myocardial iron overload in patients with thalassaemia major. *Eur J Haematol*. 2010;84(1):64-71.

93. Macdougall IC, Strauss WE, Dahl NV, Bernard K, Li Z. Ferumoxytol for iron deficiency anemia in patients undergoing hemodialysis. The FACT randomized controlled trial^[P]_[SEP]. *Clin Nephrol*. 2019;91(4):237-45.
94. Stadler N, Lindner RA, Davies MJ. Direct detection and quantification of transition metal ions in human atherosclerotic plaques: evidence for the presence of elevated levels of iron and copper. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:949-4.
95. Kletzmayer J, Hörl WH. Iron overload and cardiovascular complications in dialysis patients *Nephrol Dial Transplant*. 2002;17[Suppl 2]:25-9.
96. Rocha LA, Barreto DV, Barreto FC, et al. Serum ferritin level remains a reliable marker of bone marrow iron stores evaluated by histomorphometry in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2009;4(1):105-9.
97. Gee CS, Nguyen JT, Marquez CJ, et al. Validation of bone marrow fat quantification in the presence of trabecular bone using MRI. *J Magn Reson Imaging*. 2015;42(2):539–544.
98. Hu HH, Kim HW, Nayak KS, Goran MI. Comparison of fat-water MRI and single-voxel MRS in the assessment of hepatic and pancreatic fat fractions in humans. *Obesity (Silver Spring)*. 2010;18(4):841-7.
99. Karampinos DC, Ruschke S, Dieckmeyer M, Eggers H, Kooijman H, Rummeny EJ, Bauer JS, Baum T . Modeling of T2* decay in vertebral bone marrow fat quantification *NMR Biomed*. 2015;28(11):1535-42.
100. Shah HH, Hazzan AD, Fishbane S. Novel iron-based phosphate binders in patients with chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2015;24(4):330-5.
101. Nakanishi T, Hasuike Y, Nanami M, Yahiro M, Kuragano T. Novel iron-containing phosphate binders and anemia treatment in CKD: oral iron intake revisited. *Nephrol Dial Transplant*. 2016;31(10):1588-94.
102. Cernaro V, Santoro D, Lacquaniti A, et al. Phosphate binders for the treatment of chronic kidney disease: role of iron oxyhydroxide. *Int J Nephrol Renovasc Dis*. 2016;9:11-9.
103. Matsushima S, Tor M, Ozaki K, Narama I. Iron lactate-induced osteomalacia in association with osteoblast dynamics. *Toxicol Pathol*. 2003;31(6):646-54.
104. Mandalunis PM, Ubios AM. Experimental renal failure and iron overload: a histomorphometric study in rat tibia. *Toxicol Pathol*. 2005;33(3), 398-403.
105. Mahachoklertwattana P, Sirikulchayanonta V, Chuansumrit A, Karnsombat P, Choubtum L, Sriphrapadang A, Domrongkitchaiporn S, Sirisriro R, Rajatanavin R. Bone histomorphometry in children and adolescents with beta-thalassemia disease: iron-associated focal osteomalacia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88:3966-72.

-
106. Balogh E, Tolnai E, Nagy B Jr, Nagy B, Balla G, Balla J, Jeney V. Iron overload inhibits osteogenic commitment and differentiation of mesenchymal stem cells via the induction of ferritin *Bioch Biophys Acta*. 2016;1862:1640-9.
 107. Zarjou A, Jeney V, Arosio P, Poli M, Zavaczki E, Balla G, et al., Ferritin ferroxidase activity: a potent inhibitor of osteogenesis, *J Bone Miner Res*. 2010;25(1):164-72.
 108. Doyard M, Fatih N, Monnier A, Island ML, Aubry M, Leroyer P, Bouvet R, Chales G, Mosser J, et al. Iron excess limits HHIPL-2 gene expression and decreases osteoblastic activity in human MG-63 cells. *Osteoporos Int*. 2012;23(10):2435-45.
 109. Yang Q, Jian J, Abramson SB, Huang X. Inhibitory effects of iron on bone morphogenetic protein 2-induced osteoblastogenesis. *J Bone Miner Res*. 2011;26:1188-96.
 110. Becs G, Zarjou A, Agarwal A, Kovacs KE, Becs A, Nyitrai M, Balogh E, Banyai E, Eaton JW, Arosio P, et al. Pharmacological induction of ferritin prevents osteoblastic transformation of smooth muscle cells. *J Cell Mol Med*. 2016;20: 217-30.
 111. Cho IJ, Choi KH, Oh CH, Hwang YC, Jeong IK, Ahn KJ, Chung HY. Effects of C-reactive protein on bone cells. *Life Sci*. 2016;145:1-8.
 112. Chen B, Li GF, Shen Y, Huang XI, Xu YJ. Reducing iron accumulation: A potential approach for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Exp Ther Med*. 2015;10(1):7-11.
 113. Bezerra de Carvalho KS, Vasco R, Custodio M, et al. Chronic kidney disease is associated with low BMD at the hip but not at the spine. *Osteoporos Int*. 2019; 30(5):1015-23.
 114. Malluche HH, Monier-Faugere MC, Blomquist G, et al. Two-year cortical and trabecular bone loss in CKD-5D: biochemical and clinical predictors. *Osteoporos Int*. 2018;29:125-34.
 115. Aguiar F, Meng C, Pereira L, Brito I, Frazão JM. Bone biopsy: an ally in the management of fragility fractures in chronic kidney disease. *Acta Reumatol Port*. 2018;43(3):201-9.
 116. Wang L, Li Q, Duan XL, Chang YZ. Effects of extracellular iron concentration on calcium absorption and relationship between Ca^{2+} and cell apoptosis in Caco-2 cells. *World J Gastroenterol*. 2005;11:2916-21.
 117. Merchant RH, Shirodkar A, Ahmed J. Evaluation of growth, puberty and endocrine dysfunctions in relation to iron overload in multi transfused Indian thalassemia patients. *Indian J Pediatr*. 2011;78:679-83.
 118. Lertsuwan K, Wongdee K, Teerapornpuntakit J, Charoenphandhu N. Intestinal calcium transport and its regulation in thalassemia: interaction between calcium and iron metabolism. *J Physiol Sci*. 2018;68(3):221-32.