UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“*Status* férrico e algumas funções do estresse oxidativo de fagócitos em idosos anêmicos ou não, portadores de doenças inflamatórias crônicas.”

Iêda Maria Martinez Paíno

Ribeirão Preto

2008

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“*Status* férrico e algumas funções do estresse oxidativo de fagócitos em idosos anêmicos ou não, portadores de doenças inflamatórias crônicas.”

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do título de Doutor em Biociências Aplicadas à Farmácia.

Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Iêda Maria Martinez Paíno

Orientadora Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Ribeirão Preto

2008

RESUMO

PAINO, I.M.M. **Status férrico e algumas funções do estresse oxidativo de fagócitos em idosos anêmicos ou não, portadores de doenças inflamatórias crônicas.** 2008. 129f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Introdução. A Anemia das Doenças Crônicas (ADC) é uma desordem comum em idosos, frequentemente multifatorial, e exacerbada por citocinas pró-inflamatórias. Nesta população, o diagnóstico de anemia por deficiência de ferro (ADF) é difícil utilizando-se os testes laboratoriais convencionais, devido à prevalência destes estados crônicos. Espécies reativas de oxigênio (ERO) são produzidas por fagócitos durante o *burst* oxidativo em defesa do hospedeiro, mas são também implicadas como agentes deletérios em um grande número de desordens inflamatórias.

Objetivos. Verificar a eficiência do receptor de transferrina sérico (sTfR) e índice sTfR-log ferritina (sTfR-F) no diagnóstico da ADF e ADC; determinar os efeitos das anemias e de estados inflamatórios crônicos sem anemia no *burst* oxidativo, fagocitose, produção de óxido nítrico ($\bullet$ NO) por monócitos, e produção de ácido hipocloroso (HOCl) por neutrófilos. **Métodos.** Participaram do estudo cinquenta e três indivíduos (42 mulheres e 11 homens) idosos recrutados do departamento de Cardio-Geriatria da Rede Pública de Saúde de Ribeirão Preto-SP. A proteína C reativa (PCR), utilizada como marcador inflamatório foi analisada pela metodologia ultra-sensível. O *status* férrico foi estabelecido pelos níveis do sTfR (enzimaimunoensaio, kit *Quantikine soluble transferrin receptor*, R&D Systems, USA), ferritina sérica (ensaio quimioluminescente, kit *Ferritin Immulite®*- DPC, England) e índice sTfR-F. Foram compostos os seguintes grupos, com base nos valores de normalidade dos parâmetros PCR, concentração de hemoglobina, ferritina e sTfR: controle (n=15), ADC (n=12), inflamação (n=08), anemia inexplicável (n=06) e grupo ADF (n=12). Nenhum paciente apresentou função renal prejudicada, hemoglobinopatias, diabetes *mellitus* descompensada, doenças infecciosas ou malignas. Estudou-se o efeito da ADC, ADF, anemia inexplicável e inflamação no *burst* oxidativo, fagocitose de neutrófilos e monócitos por citometria de fluxo, produção de HOCl por neutrófilos purificados e de $\bullet$ NO produzido em cultura de monócitos em meio RPMI 1640, estimulados por lipopolissacáride (LPS).

Resultados. Os níveis de sTfR foram capazes de diagnosticar ADF em sete (58,34%) dos doze pacientes do grupo ADF. A intensidade de fluorescência (IF) do *burst* oxidativo de neutrófilos, que reflete a atividade celular, no grupo ADF foi significativamente menor que a do grupo controle ($p<0,05$), mas a IF de monócitos não foi estatisticamente diferente. As percentagens de monócitos e neutrófilos realizando *burst* oxidativo e fagocitose dos grupos ADF, anemia inexplicável e inflamação não foram estatisticamente diferentes do grupo controle. As percentagens de monócitos e neutrófilos realizando fagocitose do grupo ADC foram estatisticamente maiores que as do grupo controle ($p<0,05$). A produção de HOCl nos grupos ADC e inflamação foram estatisticamente menores comparadas ao grupo controle ($p<0,05$), enquanto houve uma superprodução de $\bullet$ NO por monócitos no grupo ADC ($p<0,05$). **Conclusão.** No presente estudo, o sTfR foi uma ferramenta diagnóstica adicional à ferritina no diagnóstico da ADF, mas o valor do índice sTfR-F não aumentou a utilidade diagnóstica do sTfR em indivíduos idosos. $\bullet$ NO parece modular a produção de HOCl, provavelmente por regular a atividade enzimática da mieloperoxidase (MPO). Estes resultados mostraram o papel importante do ferro na

ADC e ADF em manter a resposta imunológica de fagócitos durante o processo de envelhecimento.

Palavras-chave: Receptor de Transferrina sérico, Anemia das Doenças Crônicas, Anemia por Deficiência de Ferro, *Burst* oxidativo, Fagocitose, Óxido Nítrico, Ácido Hipocloroso, Inflamação, Idoso.

ABSTRACT

PAINO, I.M.M. **Iron status and some phagocytes oxidative stress functions in the elderly with or without anemia, carriers of inflammation chronic diseases.** 2008. 129f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Background: Anemia of Chronic Disease (ACD) is a very common disorder in elderly and it is often multifactorial, exacerbated by pro-inflammatory cytokines. In these people, the diagnostic of iron deficiency anemia (IDA) or iron deficiency is difficult in these patients using the conventional iron status tests, because of the prevalence of these chronic states. Reactive oxygen species (ROS) are produced by phagocytic cells during the oxidative burst in defense of the host, but it has also been implicated as a very harmful agent in an increasing number of inflammatory-mediated disorders. **Objectives:** to elucidate the use of serum transferrin receptor (sTfR) and sTfR-log ferritin index (TfR-F index) to diagnose IDA and ACD; to determinate the effects of anemia and chronic inflammatory states without anemia in some function of oxidative stress, such as oxidative burst, phagocytosis, nitric oxide ($\bullet$ NO) production by monocytes and the hypochlorous acid (HOCl) production by purified neutrophils. **Methods:** Fifty three (42 women and 11 men) elderly subjects recruited from geriatric department of healthy public system of Ribeirão Preto city were selected. The high sensitivity C-Reactive Protein (CRP) was analyzed as an inflammatory marker. The iron status was confirmed by sTfR (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA, kit Quantikine soluble transferrin receptor R&D Systems, USA), serum ferritin levels (chemiluminescence assay, kit Ferritin Immulite[®]- DPC, England) and TfR-F index. The groups were established according to the criteria CRP assay, hemoglobin analysis, ferritin and sTfR: control (n =15), ACD (n =12), inflammation (n =08), unexplained anemia (n=06), and IDA (n=12). Patients with impaired kidney function, hemoglobinopathy, decompensate diabetes *mellitus* or infectious and malignancies diseases were excluded. We also studied the effect of ACD, IDA, unexplained anemia and inflammation on oxidative burst, phagocytosis of neutrophils and monocytes by flow cytometry and HOCl generation of neutrophils and $\bullet$ NO produced by the monocytic cell culture, cultured in RPMI 1640 medium, stimulated by lipopolysaccharide (LPS). **Results:** Our results showed that sTfR could diagnose IDA in seven (58.34%) of twelve patients in IDA group. Oxidative burst fluorescence intensity of neutrophil in IDA group was lower statistically compared to control group, $p < 0.05$. Oxidative burst fluorescence intensity of monocytes did not differ significantly. The percentages of monocytes and neutrophils expressing oxidative burst and the phagocytosis did not differ significantly amongst control, IDA, unexplained anemia and inflammatory groups. However, the percentages of neutrophils and monocytes expressing phagocytosis in ACD group were statistically higher when compared to control group ($p < 0.05$). The HOCl generation in ACD, and inflammation groups were lower significant statistically than control group, $p < 0.05$, while there was an overproduction of $\bullet$ NO by monocyte in ACD group ($p < 0.05$). **Conclusion:** In the present study, the sTfR was an additional diagnostic tool to ferritin for the diagnosis of IDA, but the value of the sTfR-F index did not increase the utility diagnostic of sTfR in elderly patients. $\bullet$ NO seems modulate the HOCl production, perhaps by regulates the myeloperoxidase (MPO) enzyme activity. These results showed the important role of iron in ACD and IDA to maintaining phagocyte immune defense of organism during the aging process.

Keywords: Serum Transferrin Receptor, Anemia of Chronic Disease, Iron Deficiency Anemia, Oxidative burst, Phagocytosis, Nitric Oxide, Hypochlorous Acid, Inflammation, Elderly.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos Epidemiológicos e Sociais da População Idosa.

Aproximadamente 400 milhões de indivíduos com 60 anos ou mais viviam nos países em desenvolvimento em 2002. Até 2025, a estimativa é de que haja aproximadamente 840 milhões, o que representa 70 por cento das pessoas idosas em todo o mundo, com destaque à população asiática (OMS, 2005). Até 2050 haverá dois bilhões de idosos em todo o mundo, sendo 80% nos países em desenvolvimento.

A população brasileira, assim como a mundial, está vivendo mais. A cada ano, 650 mil novos idosos são incorporados à população brasileira, sendo que a estimativa, nos próximos 20 anos, é de que os idosos ultrapassem 30 milhões de pessoas, o que representaria 13% da população total do Brasil (IBGE, 2002). Esta estimativa, provavelmente, atingirá indivíduos com baixo nível sócio-econômico e educacional, e com uma alta prevalência de doenças crônicas e causadoras de limitações físicas.

Com a perspectiva de ampliar o conceito de “envelhecimento saudável”, a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs o programa “Envelhecimento Ativo: Uma Política de Saúde” (OMS, 2005), que é definido como processo de otimização das oportunidades de saúde, participação e segurança, com o objetivo de melhorar a qualidade de vida à medida que as pessoas ficam mais velhas. Essa mudança demográfica pode se tornar um problema de saúde pública, pois esse rápido envelhecimento, nos países em desenvolvimento, é acompanhado por mudanças dramáticas nas estruturas e nos papéis da família, assim como nos padrões de trabalho e na migração. Tais fatores contribuem muito para que menos pessoas estejam aptas a cuidar de pessoas idosas, caso haja necessidade. Isso ocorre em

virtude da procura de trabalho, atualmente, ser maior em outras cidades por pessoas mais jovens, além do aumento da mão de obra feminina no mercado de trabalho formal (WHO, 2000).

Enquanto os países desenvolvidos enriquecem antes de envelhecerem, os em desenvolvimento estão envelhecendo antes de obterem condições de enriquecimento para propiciar condições de saúde dignas aos idosos (KALACHE; KELLER, 2000).

O termo "terceira idade" surgiu na década de 50, na França, e foi utilizado para designar pessoas de qualquer idade que tinham baixa produtividade e não participavam de nenhum tipo de atividade. Com o passar do tempo, o termo passou a se referir às pessoas com mais de 60 anos, afirma Valencia (2006), e complementa: Isso mostra que os indivíduos que chegam à sexta década da vida são vistos como pessoas passivas, que formam uma população uniforme, combatendo vários mitos sobre os idosos. No entanto, quem atinge mais de 60 anos compõe um grupo heterogêneo, com diferentes experiências de vida, de condições de saúde, trabalho e níveis culturais. Atualmente fala-se em uma quinta, sexta e oitava idade, o que mostra uma forma esperançosa de ver a vida.

Em 1950, 12% das mortes no Brasil ocorreriam devido às doenças cardiovasculares; no ano 2000, essa incidência passou para 40%, indicando que o perfil de morbimortalidade típico de uma população jovem passou para um perfil característico de enfermidades crônicas. Essa mudança no perfil epidemiológico acarreta grandes custos, pois o idoso utiliza mais os serviços de saúde. Isso se deve às internações hospitalares mais freqüentes e de maior duração visto que os idosos são, muitas vezes, portadores de doenças crônicas que podem perdurar por longo

tempo, exigindo acompanhamento médico e de equipes multidisciplinares (GORDILHO et al., 2000).

A Política Nacional do Idoso (PNL) foi instituída pela Lei Federal nº 8842, de 4 de janeiro de 1994 e regulamentada em 3 de julho de 1996, pelo Decreto-Lei Federal nº 1948. A PNL é uma estratégia para a viabilidade da cidadania ao idoso, que ainda está em fase de amadurecimento na sociedade. Algumas de suas atribuições compreendem: -... Designar e apoiar os Centros Colaboradores de Geriatria e Gerontologia, preferencialmente localizados em instituições de ensino superior envolvidos na capacitação de recursos humanos em saúde do idoso e ou na produção de material científico, bem como em pesquisa nas áreas prioritárias do envelhecimento e da atenção a este grupo populacional; - Apoiar estudos e pesquisas definidos como prioritários nesta Política visando a ampliar o conhecimento sobre o idoso e a subsidiar o desenvolvimento das ações decorrentes desta Política (Política Nacional do Idoso).

Implementar políticas e programas que visam atender os interesses de saúde pública, em especial em relação ao idoso, não são objetivos necessariamente fáceis no Brasil, embora existam medidas governamentais que estimulem a prevenção, controle, erradicação e até tratamento de doenças transmissíveis (OMS, 2005). Com isso, há necessidades emergenciais da implantação prática de medidas rigorosas de assistência ao idoso, do investimento em pesquisa nesse campo, e de políticas de longo prazo que abordem o desenvolvimento social e econômico da comunidade nesta faixa etária.

1.2 Estudos de imunossenescência.

O envelhecimento é um processo em que a homeostase do organismo está diminuída e a vulnerabilidade aumentada, causando uma progressiva diminuição da capacidade física e de resposta aos estímulos ambientais (VASTO et al., 2007). Entretanto, estudos recentes indicam que a imunossenescência não é um declínio progressivo e inevitável de todo o sistema imune (SANSONI et al., 2008), e está relacionada à melhora linear e extraordinária na sobrevivência (DE MARTINIS et al., 2005). Seu papel é o resultado de um processo de remodelamento contínuo em que várias funções estão reduzidas, outras permanecem inalteradas ou até mesmo aumentadas (FRANCESCHI et al., 1995).

O compartimento inato do sistema imune, durante o envelhecimento, parece ser relativamente preservado, em relação ao compartimento adaptativo que parece exibir profundas modificações (SANSONI et al., 2008). Algumas das características importantes disto são: redução das células T *naïve* (FAGNONI et al., 2000), o acúmulo de células T efectoras CD28⁻, particularmente entre subpopulações de linfócitos T CD8⁺ e redução do espaço imunológico, além da tendência à involução tímica (GINALDI; STERBERG, 2003; DE MARTINIS et al., 2005; SANSONI et al., 2008). O acúmulo destas células T efectoras CD 28⁻, as quais são resistentes à apoptose em idades avançadas, pode também reduzir o espaço imunológico e o repertório de células T, e ser responsável pela resposta imunológica prejudicada contra novas mudanças antigênicas, que favorecem a ocorrência das principais doenças relacionadas à idade (SANSONI et al., 2008).

Uma hipótese muito comum na literatura é que o processo de envelhecimento está associado com um estado pró-inflamatório crônico (FRANCESCHI et al., 2000), caracterizado pelo aumento de citocinas pró-

inflamatórias, fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e de fatores solúveis da inflamação, os quais são prognósticos de morbidade e mortalidade no idoso (SANSONI et al., 2008). Particularmente tem se observado um progressivo aumento, com a idade, de citocinas, com destaque ao aumento progressivo da interleucina 6 (IL-6), que pode alcançar níveis 10 vezes maiores em indivíduos centenários (GIULIANI et al., 2001; SANSONI et al., 2008). Por outro lado, o receptor solúvel de IL-6 (sIL-6R) aumenta progressivamente até a sétima década de idade, e então começa a declinar atingindo níveis, em indivíduos centenários, semelhantes aos indivíduos jovens. Esta redução do sIL-6R, em centenários, parece ser um fator de longevidade, talvez por modular o estado pró-inflamatório da IL-6 (GIULIANI et al., 2001). Estudos recentes indicam que níveis aumentados de sIL-6R representam um fator prognóstico negativo para morbidade e mortalidade e, em mulheres, seus níveis aumentados parecem correlacionar com uma massa óssea reduzida (GIULIANI et al., 2001), um parâmetro associado com o aumento da mortalidade (BROWNER et al., 1991; GIULIANI et al., 2001; SANSONI et al., 2008).

Monócitos, macrófagos e neutrófilos desempenham um papel central na imunidade inata, sendo capazes de responder a uma variedade de antígenos, ou seja, a uma carga antigênica crônica (bactérias, vírus, fungos, toxinas e células mutadas) (BURKLE et al., 2007), através da resposta mediada por células e a liberação de fatores solúveis (citocinas e quimiocinas), hormônios, aminas e espécies reativas de oxigênio. Tais fatores estimulam continuamente o sistema imunológico ao longo da vida, de forma a contribuírem para o estabelecimento de um estado pró-inflamatório crônico definido como “envelhecimento-inflamatório” ou *inflamm-aging* (FRANCESCHI et al., 2000; BRUUNSGAARD; PEDERSEN; PEDERSEN, 2001; FERRUCCI et al., 2005; VASTO et al., 2007; SANSONI et al.,

2008). Esta condição favorece o desenvolvimento de doenças típicas relacionadas à idade como arteriosclerose, demência, osteoporose, neoplasias (FRANCESCHI et al., 2000; BRUUNSGAARD; PEDERSEN; PEDERSEN, 2001; DE MARTINIS et al., 2005; VASTO et al., 2007; SANSONI et al., 2008).

1.3 As anemias e as doenças crônicas no idoso.

De acordo com a WHO (1968), a anemia ocorre quando os níveis de hemoglobina (Hb) estão abaixo de 12 g/ dL para mulheres e 13 g/dL para homens, sendo que a prevalência em idosos maiores de 60 anos, em países industrializados e não industrializados, é de 12% e 45,2%, respectivamente (WHO, 2001).

Estudos epidemiológicos indicam ainda que a prevalência da anemia aumenta com o avanço da idade, especialmente após os 60 anos de idade (BERKAHN; KEATING, 2004), elevando-se drasticamente após os 80 anos (ANIA et al., 1994; SMITH, 2000). Embora tais informações estejam bem documentadas, a anemia não pode ser considerada como uma consequência normal do processo de envelhecimento (BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006). Evidências clínicas apontam a anemia não só como um sinal de uma patologia de base, mas também como uma causa de severo declínio da qualidade de vida, de morbidade, sendo um fator de risco independente para várias patologias e para a morte (PENNINX et al., 2003; JOOSTEN, 2004; GURALNIK et al., 2005; BALDUCCI; HARDY; LYMAN, 2005; EZEKOWITZ; TANG; KATZ, 2006; TERROVITIS et al., 2006; ANAND, 2008).

Anemia das doenças crônicas (ADC), deficiência de ferro e de vitaminas, e doença renal, sozinhas ou em combinação, correspondem a 2/3 dos casos de anemia em idosos; em 1/3 dos casos, a anemia no idoso parece ser de causa inexplicável (FERRUCCI et al., 2007). Outros achados da literatura preconizam que os mecanismos patofisiológicos da anemia desconhecida no idoso são discutidos e

exclusivos para esta faixa etária, tais como sarcopenia, polifarmacoterapia, diminuição dos hormônios sexuais (FERRUCCI et al., 2006), mudanças fisiológicas nas células pluripotentes da medula óssea, entre outros (GURALNIK et al., 2005).

Como a anemia é o indicador mais comumente usado para indicar deficiência de ferro, os termos anemia, deficiência de ferro (DF) e anemia por deficiência de ferro (ADF) são muitas vezes confundidos. Há, entretanto, formas leves e moderadas de deficiência, sem anemia, em que funções teciduais estão diminuídas, como, por exemplo, o aumento da susceptibilidade às doenças infecciosas, em razão da diminuição da resposta imunológica (UMBREIT, 2005). A deficiência de ferro torna-se um foco de interesse comum em pacientes geriátricos, uma vez que anormalidades no trato gastrointestinal decorrentes de tumores gástricos, carcinoma do cólon e doenças inflamatórias podem ser identificadas em mais da metade dos pacientes acometidos por esta deficiência (ANIA et al., 1997).

A ADC, também referida como anemia da inflamação, é a mais comum das anemias no idoso (BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006) e está presente em 35 % dos casos (SMITH, 2000). É uma anemia normocítica e normocrômica relativamente branda, pois os níveis de hemoglobina raramente estão abaixo de 10 g/dL, cuja gravidade correlaciona com o grau da patologia de base (SMITH, 2000; BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006). As principais patologias de base que podem causar ADC são as infecções agudas e crônicas de qualquer etiologia, neoplasias hematológicas, tumores sólidos, doenças autoimunes (WEISS; GOODNOUGH, 2005). Dentre as patologias crônicas, as doenças reumáticas são freqüentes, ocupando o segundo lugar, perdendo apenas para as cardíacas.

Acredita-se que em cada 100 indivíduos em todo mundo, 25 sofram de alguma doença reumática. Em um estudo clássico, realizado em 259 pacientes

anêmicos com mais de 65 anos, verificou-se que 36% e 44% das anemias em idosos foram causadas por deficiência de ferro e infecções/ inflamações, respectivamente (GUYATT et al., 1990).

A principal característica da ADC é a perturbação da homeostase do ferro, pois há aumento de sua entrada, mas o mesmo é retido no sistema fagocítico mononuclear. Isto ocasiona uma diversificação do tráfego do ferro, da circulação para o compartimento do estoque, a ferritina (WEISS, 2002; WEISS; GOODNOUGH, 2005).

A molécula de ferritina é formada por 24 subunidades reunidas dentro de uma cápsula esférica muito estável. Aproximadamente 4500 átomos de ferro (Fe^{+3}) podem ser estocados na sua cavidade. Este processo de seqüestro do ferro é relevante, pois os átomos de ferro são armazenados de forma não tóxica e disponível biologicamente (AROSIO; LEVI, 2002; TORTI; TORTI, 2002). As isoferritinas de mamíferos são compostas por duas subunidades, H (*Heavy*) e L (*Light*), codificadas por genes separados e, dependendo do tipo de tecido e *status* fisiológico da célula, a razão das subunidades pode variar amplamente, de um predomínio da forma L em tecidos como fígado e baço, para o predomínio da forma H no coração e rins. Estas subunidades mostram 50% de similaridade nas suas seqüências, mas têm diferentes funções. A subunidade H exibe uma atividade de ferroxidase e catalisa a primeira etapa no estoque de ferro, isto é, a oxidação de Fe^{+2} para Fe^{+3} , enquanto a subunidade L não possui atividade de ferroxidase e está envolvida na formação característica do ferro no centro da cavidade da molécula. Uma terceira subunidade, a G, é encontrada no plasma, e parece ser derivada da glicosilação da subunidade L, durante o processo de secreção. Os mecanismos de produção da ferritina sérica são pouco conhecidos, mas está claro que níveis de

ferritina sérica refletem o nível de estoque de ferro corporal (TESTA 2002; TORTI; TORTI, 2002; AROSIO; LEVI, 2002).

Acredita-se que a eritropoese esteja comprometida na ADC devido ao aumento da secreção de citocinas envolvidas nos fenômenos inflamatórios, em especial a IL-1, IL-6, TNF- α e o interferon- γ (IFN- γ), o que pode exacerbar o estado pró-inflamatório crônico no idoso. Essas citocinas são responsáveis pelo impedimento da liberação de ferro por macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (WIEL, 2004; WEISS, 2005). Enquanto o IFN- γ e/ou LPS aumentam a expressão do transportador de metal divalente 1 (DMT-1), estimulando a entrada de íons ferrosos em macrófagos, estas mesmas citocinas regulam negativamente a expressão da ferroportina-1, inibindo a exportação do ferro destas células (WEISS; GOODNOUGH, 2005). Desta forma, a biodisponibilidade do ferro e sua utilização pelas células progenitoras eritróides da medula óssea estão prejudicadas na ADC, além das citocinas atuarem sobre tais células da medula inibindo sua diferenciação (WEISS, 2002; 2005). Pacientes que apresentam quadro de inflamação crônica podem exibir aumento da ferritina, e conseqüente bloqueio de sua liberação para os eritroblastos medulares (WIEL, 2004; WEISS, 2005).

Outro mecanismo envolvido na patofisiologia da ADC é a produção inadequada de eritropoetina frente ao grau da anemia (WEISS; GOODNOUGH, 2005; GURALNIK et al., 2005; BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006). Vale ressaltar que a taxa de filtração glomerular está diminuída durante o processo de envelhecimento, o que também pode estar relacionada à diminuição dos níveis de eritropoetina no idoso (BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006). Outras anormalidades como apoptose acelerada de eritrócitos parece estar sendo

modulada por citocinas pró-inflamatórias, principalmente IL-1, IL-6 e TNF- α (EISENSTAEDT, 2006).

Deficiência ou sobrecarga de ferro, eritropoese acelerada, hipóxia e inflamação são algumas situações que levam às mudanças na absorção de ferro intestinal e distribuição de ferro tissular (GANZ, 2003; ANDREWS, 2005). A hepcidina, um peptídeo produzido no fígado recentemente descoberto, parece desempenhar um papel crucial nestas alterações ocorridas nas doenças inflamatórias crônicas (BRUGNARA, 2003; GANZ, 2006).

A hepcidina é um regulador negativo da absorção intestinal do ferro, atuando na reciclagem de ferro pelos macrófagos e mobilização dos estoques hepáticos. Seu mecanismo de ação parece estar relacionado com a inibição da exportação de ferro através da ferroportina, o único exportador de ferro conhecido de enterócitos, macrófagos e hepatócitos (GANZ, 2003; WEISS, 2005). Sua síntese é marcadamente induzida pela IL-6 durante infecção e inflamação, fazendo com que o ferro seja retido nos macrófagos, hepatócitos e enterócitos, o que contribui para hipoferremia e, conseqüentemente, a anemia associada a estes processos (NEMETH et al., 2004; WEISS, 2005; GANZ, 2005; GANZ, 2006). Os níveis de hepcidina estão aumentados na sobrecarga de ferro e inflamação, enquanto que estão diminuídos nos casos de deficiência de ferro, eritropoese acelerada e hipóxia (ANDREWS, 2004; 2005).

Por outro lado, a hipoferremia poderia funcionar como um mecanismo de defesa do sistema imune inato por reduzir a disponibilidade desse metal, essencial como nutriente ao microrganismo invasor (NEMETH et al., 2004; WEISS, 2005; THEURL et al., 2008). No contexto da inflamação, um destaque especial deve ser dado à lactoferrina, proteína de ligação ao ferro encontrada no leite, secreções

mucosas, suor e grânulos de neutrófilos (WEISS, 2005). Ela é secretada no sítio da inflamação por neutrófilos, alterando também o tráfego do ferro por se ligar ao mesmo em meio ácido com grande afinidade, restringindo também sua disponibilidade aos microrganismos (LIEU et al., 2003; WEISS, 2005). Além disso, macrófagos não produzem lactoferrina, mas expressam receptores para esta molécula, internalizando-a (WEISS, 2005), o que também contribui para o processo de hiperferritinemia e hipoferremia encontrado na ADC.

1.4 Diagnóstico laboratorial.

O diagnóstico da deficiência de ferro poderia ser simples se não fosse influenciado por muitas desordens clínicas que alteram o metabolismo de ferro. A característica mais comum na maioria destas desordens clínicas é a inflamação, que prejudica o suprimento de ferro para o plasma.

Níveis de ferritina sérica são considerados um dos melhores parâmetros para diagnóstico de deficiência de ferro. Entretanto, em idosos, a determinação dos níveis de ferritina não é segura, o limite inferior de normalidade ainda não está bem definido, além de ter que considerar a elevação dos seus níveis devido à presença concomitante de outras patologias, especialmente desordens inflamatórias (GUYATT et al., 1990; SUOMINEN et al., 2000; RIMON et al., 2002). Desta forma, o diagnóstico da ADF em indivíduos idosos é difícil, por causa da alta prevalência de doenças crônicas que podem causar eritropoese deficiente de ferro, mesmo na presença de altos níveis de ferritina (RIMON et al., 2002).

A distinção entre ADF e ADC requer medidas mais apuradas relacionadas à necessidade de ferro tissular, uma vez que a ferritina sérica, para identificar ADF, está comprometida pelo efeito da inflamação (COOK, 2005). Assim, o nível de

receptores de transferrina séricos (sTfR) poderia ser um bom indicador da avaliação da deficiência de ferro (MARGETIC et al., 2005; MARKOVIC; MAJKIC'-SINGH; SUBOTA, 2005; SUOMINEN et al., 1998; 2000).

Os receptores de transferrina (TfR) são glicoproteínas transmembrânicas que contêm duas subunidades idênticas, cada uma pesando 95 KDa, cuja maior porção da proteína é externa à célula (COOK, 1999). Os TfR são expressos em larga escala em membranas dos eritroblastos, e estão expressos também em menor quantidade nos reticulócitos, com a função de mediar o processo de endocitose do ferro, que é utilizado na síntese de hemoglobina. O receptor de transferrina sérico (sTfR) é uma forma solúvel e truncada, que perde os primeiros 11 resíduos de aminoácidos, como resultado da clivagem proteolítica do receptor de membrana por uma serina protease, produzindo um fragmento solúvel circulante.

A transferrina diférrica liga-se ao receptor formando o complexo sTfR-TfR, o qual é internalizado por endocitose e acidificado (pH 5,5) através de uma bomba de prótons, resultando na dissociação do ferro da transferrina. O íon férrico endossomal é convertido a íon ferroso por uma ferriredutase, que tem sido identificada como STEAP3 (DE DOMENICO; MC VEY WARD; KAPLAN, 2008). A liberação do ferro do fagossomo para o interior da célula ocorre por meio do DMT-1, sendo o complexo sTfR-TR posteriormente dissociado e levado novamente à superfície da célula para um novo ciclo da transferrina (Figura 1). A citocina antiinflamatória interleucina-10 (IL-10) regula positivamente a expressão do TfR-1, aumentando a entrada de transferrina ligada ao ferro em monócitos (WEISS; GOODNOUGH, 2005).

Figura 1: Endocitose do complexo ferro, transferrina e receptor de transferrina. Adaptado de DE DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2008.

Diversos estudos demonstram a existência de uma relação constante entre os níveis teciduais de TfR e as concentrações séricas de sTfR (CONRAD, 1999; COOK, 1999).

A determinação dos sTfR e os índices que relacionam os níveis de receptores de transferrina e de ferritina ($\text{transferrina/log ferritina}$, TfR-F) têm sido apontados como parâmetros promissores para avaliação do *status* férrico. A combinação dessas duas determinações fornece alta sensibilidade e especificidade, podendo-se prever que estas medidas seriam melhores do que os parâmetros convencionais do *status* férrico, tais como ferro sérico, saturação de transferrina e capacidade total de ligação do ferro (CTLF) (SUOMINEN et al., 1998; 2000).

Uma série de estudos recentes apontam que as aplicações clínicas mais importantes do sTfR são: distinguir entre ADF e ADC e detectar a deficiência

funcional de ferro presente na ADC (PUNNONEN; IRJALA; RAJAMÄKI, 1997; SUOMINEN et al., 2000; WIANS et al., 2001). Em contraste à ferritina, a concentração de sTfR não é afetada pela presença da inflamação (MARGETIC et al., 2005) e da idade (JOOSTEN, 2004). Além disso, a concentração de ferritina varia de acordo com o estoque total de ferro corporal, enquanto que a concentração de sTfR reflete o grau de suprimento de ferro tissular (MARKOVIC; MAJKIC´-SINGH; SUBOTA, 2005). Se a deficiência de ferro coexiste com ADC, a concentração de sTfR torna-se elevada proporcionalmente ao grau da deficiência de ferro (MAST et al., 1998).

Publicações recentes indicam que os marcadores bioquímicos, sTfR e índice TfR-F, além de serem ferramentas diagnósticas extremamente úteis, servem também para avaliarem e monitorarem o tratamento correto com eritropoetina recombinante humana e/ ou suplementação oral ou não de ferro (THOMAS et al., 2006). Estes dados indicam que o sTfR e o índice TfR-F são uma alternativa para testes diagnósticos da deficiência de ferro na presença de doenças crônicas, se houver a exclusão de patologias malignas que possam afetar a atividade eritropoética da medula óssea. Por outro lado, um estudo realizado com adolescentes indicou que os níveis de sTfR não oferecem vantagem sobre a ferritina na avaliação de estágios precoces e intermediários da deficiência de ferro (CHOI, 2005). Estas controvérsias da literatura indicam a necessidade de maiores investigações em relação ao sTfR, especialmente em relação ao idoso, uma vez que publicações são escassas nesta faixa etária.

O diagnóstico de ADC sempre requer uma avaliação extremamente cuidadosa do *status* de ferro corporal para diferenciar esta condição da ADF. Além disso, é de grande utilidade incluir-se um marcador de inflamação na triagem

diagnóstica, como a proteína C reativa (PCR). Esta é geralmente considerada um dos melhores marcadores laboratoriais de processos inflamatórios, sendo recentemente alterada pelo desenvolvimento de metodologias mais sensíveis para a determinação de doença cardíaca coronariana, como a PCR ultra-sensível (COOK, 2005). A PCR, proteína produzida durante a fase aguda das doenças, encontra-se presente em várias patologias, sendo também um sinal fidedigno do processo inflamatório, por estar presente seis horas após o início do processo (COOK, 2005; CHENILLOT et al., 2000). A determinação dos níveis de PCR é recomendada não só durante processos inflamatórios agudos, mas também durante processos infecciosos e inflamatórios crônicos (DAYER; DAYER; ROUX-LOMBARD, 2007).

1.5 Interações entre o metabolismo de ferro e o estresse oxidativo de fagócitos.

O ferro é um elemento extremamente importante para o organismo desempenhar funções básicas, como transporte de oxigênio, síntese de hormônios, proliferação e diferenciação celular, cadeia respiratória e transferência de elétrons, regulação gênica (ANDREWS, 2005; ANDREWS; SCHMIDT, 2007). A manutenção da homeostase do ferro é de extrema importância para se evitar os efeitos prejudiciais tanto da deficiência quanto do excesso, sendo necessário ser um sistema essencialmente fechado. O excesso de ferro livre pode ocasionar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), resultando no ataque aos lipídios celulares, proteínas e ácidos nucleicos, e eventual morte celular (TESTA, 2002; ANDREWS, 2005). A deficiência compromete vários estágios da imunidade inata e adquirida.

Os neutrófilos desempenham um papel primordial na resposta imune inata contra patógenos, por meio de espécies oxidantes, peptídeos microbianos e enzimas

líticas (QUINN; GAUSS, 2004). A geração destes metabólitos microbicidas oxidantes resulta da ativação de um complexo enzimático multiprotéico, conhecido como complexo NADPH oxidase (Nicotinamida-Adenina-Dinucleotídeo-Fosfato reduzido oxidase) (BABIOR, 2002; SHEPPARD et al., 2005), que está expresso não só em células fagocíticas (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998), mas também em células não fagocíticas leucocitárias e células não leucocitárias, desempenhando papéis distintos em sinalizações intra e inter celulares (DROGE, 2002; QUINN; GAUSS, 2004).

Este complexo enzimático é responsável pela transferência de elétrons de NADPH ao oxigênio, formando inicialmente o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$). A produção de $O_2^{\bullet-}$ é dependente da translocação de suas subunidades protéicas localizadas no compartimento de membrana e no citosol, que ocorre após a ativação, mas que permanecem separados no estado quiescente, ou seja, não ativado (Figura 2A). As subunidades protéicas do compartimento de membrana compreendem a glicoproteína (gp) 91^{phox} (phox, *phagocyte oxidase*), p22^{phox}, e uma pequena proteína G denominada Rap 1A; no citosol, compreendem a p47^{phox}, p67^{phox}, p40^{phox}, duas proteínas G, a Rac 2 e a Cd 42, além de uma nova proteína recentemente identificada, a p29 peroxirredoxina (GROEMPING; RITTINGER, 2005; SHEPPARD et al., 2005). As subunidades gp91^{phox} e p22^{phox} formam o citocromo b558, se ligam à flavina adenina dinucleotídeo (FAD), o qual serve como um sítio de ligação à NADPH (QUINN; GAUSS, 2004; SHEPPARD et al., 2005), e aos dois grupos prostéticos heme, que requerem átomos de ferro para a atividade de NADPH oxidase (KURTOGLU et al., 2003).

Quando as células são expostas a estímulos, o componente citosólico é fosforilado e migra para a membrana, onde se associa ao citocromo b558, na

presença das proteínas Rac2, que nas células em repouso, se localiza no citoplasma em um complexo dimérico Rho-GDI (*Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor*). A Rac2 se dissocia do Rho-GDI durante a ativação e se liga à guanosina trifosfato (GTP) (BABIOR, 1999; SHEPPARD et al., 2005). A RAP 1A e o Cd42 também estão envolvidas neste processo. Assim o complexo NADPH oxidase é completamente ativado e cataliticamente ativo (Figura 2B). Este sistema é responsável pelo *burst* oxidativo, definido como uma cascata de eventos bioquímicos, rápida e extensa, decorrente da ativação fagocítica, com subsequente geração e liberação maciça das ERO.

A fagocitose estimula o *burst* oxidativo com consumo de oxigênio, glicogenólise, oxidação aumentada de glicose, pela via glicolítica hexose-monofosfato, e produção de ERO (BABIOR, 1999; 2002). A ativação de fagócitos pode ocorrer por mecanismos mediados ou não por receptores. Dentre os que independem de receptor, destacam-se os ácidos graxos insaturados de cadeia longa, o acetato de forbol miristato (PMA), que ativa o *burst* oxidativo através da ativação direta da proteína cinase C (PKC), por ser um análogo estrutural do diacilglicerol (DAG), ionóforos de cálcio, além do próprio DAG (BABIOR, 2002; SHEPPARD et al., 2005). A deficiência de ferro predispõe os pacientes aos processos infecciosos e, provavelmente, o complexo enzimático NADPH oxidase, que contém os grupos prostéticos heme, está envolvido (KURTOGLU et al., 2003).

Um estágio intermediário entre o estado quiescente e o de ativação do complexo enzimático NADPH oxidase é conhecido como efeito *priming*, definido pelo aumento da geração de $O_2^{\bullet -}$ em resposta a um estímulo secundário rápido, tais como fator de ativação de plaquetas, PAF, leucotrieno B_4 (LTB_4), fração C5a do

complemento, ou por um estímulo longo (15 a 60 minutos), como lipopolissacáride (LPS), TNF- α (SHEPPARD et al., 2005).

A

ATIVAÇÃO

B

Figura 2: Mecanismo de formação de ERO a partir do complexo NADPH oxidase. A: estado quiescente. B: estado ativado. Adaptado de SHEPPARD et al., 2005.

Espécies como o $O_2^{\bullet-}$, uma vez geradas, sofrem dismutação para peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espontaneamente ou por processo enzimático, via superóxido dismutase (SOD) e, ambos $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 , levam à formação de uma série de outras ERO, conforme mostra o esquema (BABIOR, 1999; 2002):

A quantidade de peróxido de hidrogênio formado no fagolisossomo muitas vezes é insuficiente para induzir o microrganismo à morte. Assim, o organismo utiliza um outro mecanismo cujo produto formado constitui o mais eficiente agente bactericida, o ácido hipocloroso (HOCl) (WINTERBOURN, 2002; BABIOR, 2002; MUTZE et al., 2003). A enzima mieloperoxidase (MPO) catalisa a formação do ácido hipocloroso, na presença de íons cloreto (PODREZ; ABU-SOUD; RAZEN, 2000; WINTERBOURN, 2002):

O HOCl é extremamente reativo, sendo primeiro liberado no compartimento fagolisossomal, combinando-se rapidamente com proteínas microbianas e lipídios, oxidando-os. Em condições patológicas, neutrófilos podem liberar seus componentes citotóxicos para o meio extracelular, envolvendo ERO e outras espécies reativas de nitrogênio (ERN), danificando tecidos e modulando a resposta inflamatória (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007).

A MPO é um complexo protéico heme de aproximadamente 150 kDa., abundante em neutrófilos e monócitos, sendo responsável por 5% e 1 a 2%, respectivamente, do peso seco destas células (NAUSEEF; MALECH, 1986). Esta heme proteína é estocada nos grânulos primários ou azurófilos de neutrófilos e secretada, durante a ativação, para o meio extracelular e fagolisossomal. No estado

fundamental ou nativo, a MPO está na forma férrica MPO-Fe (III), possuindo múltiplos estados intermediários de oxidação e redução (compostos I a IV), os quais são influenciados por espécies reativas como $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , óxido nítrico ($^{\bullet}NO$), entre outros, em seu ciclo catalítico de ação (PODREZ; ABU-SOUD; RAZEN, 2000; ABU-SOUD; RAZEN, 2000).

Em certas condições, o ferro pode ainda facilitar a formação de ERO que também podem ser deletérias para a célula. Uma potente espécie que atua como agente oxidante, em sistemas biológicos, é o radical hidroxil ($OH^{\bullet}$), que é produzido, em geral, a partir de reações que compreendem H_2O_2 e íons ferro ou cobre, como demonstra a reação de Fenton/ Haber Weiss descrita a seguir (RAMOS et al., 1992; ROSEN et al., 1995; NAPPI; VASS, 2002; MLADENKA et al., 2006; DROGE; SCHIPPER, 2007).

O $OH^{\bullet}$ pode ainda ser formado através da reação entre HOCl e $O_2^{\bullet-}$:

O $OH^{\bullet}$ é extremamente reativo com a maioria das moléculas biológicas causando modificações no DNA, inativação enzimática e peroxidação lipídica (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; RADI, 2004; MLADENKA et al., 2006; BROWN; BORUTAITE, 2006).

Desde a sua descoberta como mediador endógeno, o $^{\bullet}NO$ é uma ERN amplamente investigada por seus efeitos na maioria dos sistemas do organismo, modulando efeitos fisiológicos nos sistemas nervoso, cardiovascular, imunológico

(EISERICH; PATEL; O'DONNEL, 1998; RADI, 2004; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007), e na homeostasia (VANNI et al., 2007). Dentre esses efeitos, destaca-se a ativação da enzima guanilato ciclase, inibição da agregação plaquetária, relaxamento da musculatura lisa, vasodilatação (EISERICH; PATEL; O'DONNEL, 1998; DROGE, 2002; RADI, 2004; VANNI et al., 2007).

A geração de NO resulta da conversão de aminoácidos L-arginina a L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) tanto constitutiva (NOS 1 e 3), quanto induzida (NOS 2 ou NOSi), a qual tem sua expressão aumentada por um estímulo inflamatório (EISERICH; PATEL; O'DONNEL, 1998; DROGE, 2002; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). NO pode ser tanto um sinalizador fisiológico, quando presente em concentrações de 100 a 500 nM, quanto modular processos inflamatórios, infecciosos e relacionados a patologias degenerativas, quando presente em concentrações maiores que 1 a 3 μM (EISERICH; PATEL; O'DONNEL, 1998; VANNI et al., 2007; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Isso demonstra seu importante papel no metabolismo do ferro, na patogênese da ADC e em vários mecanismos patofisiológicos da inflamação sistêmica (EISERICH; PATEL; O'DONNEL, 1998; KIM; PONKA, 2002a; 2003; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007).

Como o NO é amplamente difusível, pode reagir com outras espécies reativas, tais como $\text{O}_2^{\bullet-}$, produzindo uma série de intermediários tóxicos (MLADENKA et al., 2006). Dentre estes, destaca-se o peroxinitrito (ONOO^-), radical dióxido de nitrogênio ($\text{NO}_2^{\bullet}$), trióxido de dinitrogênio (N_2O_3) (NAPPI; VASS, 2002) e íon nitrosônio (NO^+) (KIM; PONKA, 2002a). Estes, por sua vez, reagem com uma série de moléculas biológicas, tais como lipídios, DNA, grupos tióis, metais e aminoácidos, levando à modificação das biomoléculas pela nitração ou oxidação, ocasionando amplos efeitos deletérios como perda da função enzimática, alterações

na integridade de membranas e mutações no DNA (EISERICH; PATEL; O'DONNELL, 1998; NAPPI; VASS, 2002; MLADENKA, et al., 2006; FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007). Além disso, o $\cdot\text{NO}$ pode reagir com outros mediadores da inflamação, como o HOCl ou MPO (EISERICH et al., 1998).

Os dados da literatura que relacionam deficiência de ferro e função de fagócitos são controversos e muito escassos, principalmente em relação aos idosos. Desta forma, tornam-se necessárias mais investigações para o esclarecimento destas controvérsias.

1.5.1 Papel das IRP-1 e IRP-2 na manutenção da homeostase intracelular do ferro.

O controle molecular do metabolismo do ferro, em células de mamíferos, implicado na sua homeostase celular, é regulado pelos níveis intracelulares de ferro, através de interações entre proteínas reguladoras do ferro 1 e 2 (IRP-1 e IRP-2) e RNA mensageiros (RNAm) específicos (KIM; PONKA, 2002a; b; LIEU et al., 2001).

As IRP-1 e IRP-2 se ligam aos elementos responsivos ao ferro (IRE), localizados em regiões diferentes dos RNA mensageiros, que codificam proteínas envolvidas no metabolismo do ferro como cadeias leves e pesadas de ferritina, aconitase mitocondrial, receptor de transferrina-1 (TfR-1), entre outros. Dependendo da região em que a IRP se liga ao IRE, este pode agir tanto na ativação quanto na repressão da tradução. Sob condições em que há deficiência de ferro, a ligação das IRPs ao IRE, presente na região 5' não traduzida no RNAm da ferritina, promove o bloqueio da tradução de ferritina. Por outro lado, a mesma ligação na região 3' não traduzida no RNAm do TfR1, promove o aumento de sua estabilidade, aumentando a expressão do receptor de transferrina-1, na superfície celular. Nas condições em

que há níveis elevados de ferro, a ligação das IRPs ao IRE é inibida, resultando na tradução eficiente da ferritina e uma diminuição da estabilidade do TfR1, conforme demonstra a Figura 3 (LIEU et al., 2001; HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004; RECALCATI et al., 2006).

A IRP-2 não tem atividade de aconitase por perder o cluster $[4Fe-4S]$; em condições de sobrecarga de ferro, é alvo de degradação proteossômica, enquanto que na deficiência de ferro, é estabilizada (KIM; PONKA, 2002b). A IRP-1, além de atuar como proteína ligando-se ao RNAm, exibe atividade de enzima aconitase citosólica, cuja função é isomerizar reversivelmente citrato a isocitrato, durante o ciclo do ácido tricarboxílico, devido a presença de um *cluster* catalítico $[4Fe-4S]$ (CAIRO et al., 2002; PANTOPOULOS, 2004). Nas condições em que há níveis elevados de ferro, o *cluster* se mantém reunido e a IRP-1 desempenha função de aconitase.

Figura 3: Regulação molecular da IRP-1 no IRE da ferritina e TfR. Adaptado de CALADO et al., 2004.

Em condições em que há deficiência de ferro, há remoção do *cluster* do sítio ativo da aconitase, permitindo que a IRP-1 se comporte como proteína de ligação ao IRE no RNAm da ferritina e do TfR. Durante este processo, a IRP-1 expõe seus grupos SH, que reconhecem os IRE no RNAm. Os mecanismos que regulam a inserção ou remoção do *cluster* no sítio ativo da enzima aconitase são desconhecidos. O quarto átomo de ferro que compõe o *cluster* é lábil, sendo, portanto, facilmente removido por ERO, como peróxido de hidrogênio. Desta forma, a aconitase/IRP-1 perde sua atividade como enzima, mas não perde a propriedade de se ligar ao RNAm (BRAZOLOTTO et al., 1999; CAIRO et al., 2002; PANTOPOULOS, 2004; MLADENKA et al., 2006).

A atividade de ligação das IRPs não é só modulada pelo ferro, mas também por outros fatores como hipóxia, e algumas ERO (KIM; PONKA, 2002b), como H_2O_2 , $O_2^{\bullet-}$, NO e HOCl (PANTOPOULOS; HENTZE, 1995; PANTOPOULOS et al., 1997; KIM; PONKA, 2002a;b; MUTZE et al., 2003; PANTOPOULOS, 2004). Nos últimos anos, alguns autores relatam que a IRP-1 é rapidamente ativada pelas espécies reativas H_2O_2 e $^{\bullet}NO$, geradas durante o *burst* oxidativo, ligando-se ao IRE no RNAm (PANTOPOULOS et al., 1997; LIEU et al., 2001; MUTZE et al., 2003; PANTOPOULOS, 2004). Concentrações de HOCl parecem inibir a ativação da IRP-1 mediada por H_2O_2 (MUTZE et al., 2003). Estes achados indicam que a regulação do metabolismo do ferro ocorre tanto em situações fisiológicas quanto patológicas (EISENSTEIN; BLEMINGS, 1998).

$^{\bullet}NO$ parece ainda correlacionar negativamente com os níveis de Hb, pois a redução dos níveis de Hb pode estar ocorrendo via repressão da enzima aminolevulinato sintase eritróide (eALA) no RNAm pela IRP-1. A limitação do

aminolevulinato restringe a concentração do heme que, por sua vez, limita a síntese de Hb (DOMACHOWSKE, 1997).

Alguns autores estabelecem que tanto $\cdot\text{O}_2^-$ quanto $\cdot\text{NO}$ podem liberar o ferro da ferritina em condições inflamatórias, representando um passo importante na propagação dos efeitos deletérios do *pool* de ferro livre em interação com ERO e ERN (BIEMOND et al., 1988; REIF; SIMMONS, 1990; RYTER; TYRRELL, 2000; MLADENKA et al., 2006).

Publicações recentes ainda defendem a idéia de que o $\cdot\text{NO}$ ataca e oxida o *cluster* [4Fe-4S] da aconitase citosólica, induzindo seu desarranjo e, conseqüentemente, o aumento da afinidade de ligação da IRP-1 ao IRE (CAIRO; RECALCATI, 2007; MLADENKA et al., 2006; CAIRO et al., 2002; DOMACHOWSKE, 1997).

Estes achados estabelecem uma conexão distinta de regulação entre o metabolismo do ferro e o estresse oxidativo. O mecanismo molecular desta regulação ainda necessita de maiores investigações, mas é preconizado que as vias de sinalização envolvam várias proteínas cinases como a PKC, entre outros (PANTOPOULOS; HENTZE, 1995, 1998; EISENSTEIN; BLEMININGS, 1998; LIEU et al., 2001; MUTZE et al., 2003).

As investigações para explorar todos estes mecanismos de ações, ainda tidos como obscuros, serão úteis para contribuir para o estado da arte, especialmente em relação aos idosos, onde a ocorrência de deficiência de ferro e/ou doenças crônicas é freqüente e com sério comprometimento do *status* imune.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que:

- A determinação dos níveis de sTfR e índice sTfR/ log ferritina forneceram melhor sensibilidade e especificidade do que a ferritina no diagnóstico de ADF em pacientes idosos, permitindo o diagnóstico diferencial entre ADC e ADF na população estudada;
- Os valores do índice sTfR-F não aumentaram a utilidade diagnóstica do sTfR, evidenciando a necessidade de se estabelecer um valor de *cut off* menor para idosos, em virtude dos níveis de ferritina nesta faixa etária serem maiores;
- O *burst* oxidativo de neutrófilos está diminuído na ADF;
- O *burst* oxidativo de monócitos não sofreu alteração em todos os grupos em estudo;
- O percentual de neutrófilos e monócitos positivos para a fagocitose está aumentado no grupo ADC;
- O grupo ADC apresentou uma superprodução de NO_2^- e, portanto, de $^*\text{NO}$, estatisticamente significativa, acima de $50 \mu\text{M}$, em monócitos. Concentrações exacerbadas foram também demonstradas nos grupos inflamação, anemia e ADF, embora sem significância estatística;
- Concentrações de HOCl produzidas por neutrófilos purificados dos grupos ADC e inflamação foram estatisticamente menores em relação ao grupo controle. As produções de HOCl nos grupos anemia e ADF foram menores que $10 \mu\text{M}$, embora sem diferença estatística significativa;

- Existe uma relação inversa entre a produção dos níveis de HOCl e os níveis de NO_2^- , e portanto de $\cdot\text{NO}$, nos grupos ADC, inflamação, anemia e ADF;
- A ADC prejudicou as funções de fagócitos imunossenescientes nos processos da imunidade inata. Isto provavelmente ocorreu devido à interação existente entre o metabolismo de ferro e espécies radicalares geradas durante este processo.

Muitas questões permanecem não esclarecidas e necessitam de mais estudos, como por exemplo, o possível dano específico ao TfR por espécies reativas, os processos de nitração e as possíveis interferências no ciclo catalítico da MPO.

7. REFERÊNCIAS

ABU-SOUD, H. M.; HAZEN, S. L. Nitric oxide modulates the catalytic activity of myeloperoxidase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.275, p.5425–30, 2000.

AHLUWALIA, N; SUN, J.; KRAUSE, D.; MASTRO, A.; HANDTE, G. Immune function is impaired in iron-deficient, homebound, older Women. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.79, p.516 –21, 2004.

ALVARADO, C; ALVAREZ, P; PUERTO M.; GAUSSERÈS, N.; JIMENEZ, L; DE LA FUENTE, M. Dietary supplementation with antioxidants improves functions and decreases oxidative stress of leukocytes from prematurely aging mice Basic nutritional investigation. **Nutrition**, Burbank, v. 22, p.767–777, 2006a.

ALVARADO, C; ALVAREZ, P; JIMENEZ, L; DE LA FUENTE, M. Oxidative stress in leukocytes from young prematurely aging mice is reversed by supplementation with biscuits rich in antioxidants. **Dev. Comp. Immunol.**, Elmsford, v.30, p.1168–1180, 2006b.

ANAND I. S. Heart failure and anemia: mechanisms and pathophysiology. **Heart Fail Rev.**, Norwell, v.13, n.4, p.379-86, 2008.

AROSIO, P.; LEVI, S. Ferritin, Iron Homeostasis, and Oxidative Damage. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 33, n.4, p. 457–463, 2002.

ANDREWS, N.C. Pathology of iron metabolism. In HOFFMAN, R.; BENZ. E.; SHATTIL, S.; FURIE, B.; COHEN, H. **Hematology: Basic Principles and Practice**. 4th ed., Philadelphia, 2004, Churchill Livingstone, Chap.31, p. 475.

ANDREWS, N.C. Molecular control of iron metabolism. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, London, v. 18, n. 2, p. 159–169, 2005.

ANDREWS, N.C; SCHMIDT, P.J. Iron Homeostasis. **Annu. Rev. Physiol.**, Palo Alto, v. 69, p.69–85, 2007.

ANIA, B.J.; SUMAN, V.J.; FAIRBANKS, V.F.; MELTON, L.J. Prevalence of anemia in medical practice: community versus referral patients. **Mayo Clin. Proc.**, Rochester, v.69, p.730–735, 1994.

BABIOR, B.M. NADPH oxidase: an update. **Blood.**, Washington, v. 93, n.5, p.1464-76, 1999.

BABIOR, B.M. The leukocyte NADPH oxidase. **Isr. Med. Assoc. J.**, Ramat Gan, v. 4. n.11, p. 1023-4, 2002.

BABIOR, B.M.; COHEN, H.J. Measurement of neutrophil function: phagocytosis, degranulation, the respiratory burst and bactericidal killing. In: CLINE, M.J. **Methods in hematology: leucocyte function**. New York: Churchill Livingstone, 1981. p.13.

BALDUCCI, L.; HARDY, C.L.; LYMAN, G.H. Hemopoiesis and aging. In: BALDUCCI, L.; EXTERMANN, M. (Eds). **Biological basis of geriatric oncology**. New York, Springer; 2005. p. 111–134.

BALDUCCI, L.; ERSHLER, W.B.; KRANTZ, S. Anemia in the elderly-Clinical findings and impact on health. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, Boca Raton, v.58, n.2, p.156-65, 2006.

BERGMAN, M; SALMAN, H; PINCHASI, R; STRAUSSBERG, R; DJALDETTI, M; BESSLER, H. Phagocytic capacity and apoptosis of peripheral blood cells from patients with iron deficiency anemia. **Biomed. Pharmacother.**, New York, v. 59, p. 307–311, 2005.

BERKAHN, L.; KEATING, A. Hematopoiesis in the elderly. **Hematology**, London, v 9, n.3, p.159-63, 2004.

BIAN, K.; GAO, Z.; WEISBRODT, N.; MURAD, F. The nature of heme/ iron-induced protein tyrosine nitration. **Biochemistry**, Philadelphia, v.100, n.10, p.5712-17, 2003.

BIEMOND, P.; SWAAK, A.J.; VAN EIJK, H.G.; KOSTER, J.F. Superoxide dependent iron release from ferritin in inflammatory diseases. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.4, p.185-198, 1988.

BOLGER, A.P.; DOEHNER, W.; SHARMA, R.; COATE, J.S.; ANKER, S. Anemia in chronic heart failure: the relationship to inflammatory cytokine production and prognostic importance. **Circulation**, Philadelphia, v. 106, 2819A, 2002.

BRASIL. LEI N° 8.842 de 4 de janeiro de 1994. Dispõe sobre a Política Nacional do Idoso, cria o Conselho Nacional do Idoso e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 5 de janeiro de 1994, seção IV.

BRAZZOLOTTO, X.; GAILLARD, J.; PANTOPOULOS, K; HENTZE, M.W.; MOULINS, J.M. Human cytoplasmatic aconitase (iron regulatory protein-1) is converted into its [3Fe-4S] form by hydrogen peroxide in vitro, but is not activated for iron responsive element binding. **J. Biol.Chem.**, Baltimore, v.274, p.21625-630, 1999.

BROWNER, W.S.; SEELEY, D.G.; VOGT, T.M.; CUMMINGS, S.R., Non trauma mortality in elderly women with low bone mineral density. Study of Osteoporotic Fractures Research Group. **Lancet**, Paris, v. 338, p.355–358, 1991.

BROWN, G.C.; BORUTAITE, V. Interactions between nitric oxide, oxygen, reactive oxygen species and reactive nitrogen species. **Biochem. Soc Trans.**, London, v. 34, part 5, 2006.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clin. Chem.**, Washington, v.49-10, p.1573-8, 2003.

BRUUNSGAARD, H.; PEDERSEN, M.; PEDERSEN, B.K. Aging and proinflammatory cytokines. **Curr. Opin. Hematol.**, Cambridge, v.8, p.131–136, 2001.

BÜRKLE, A.; CASELLI, G.; FRANCESCHI, C.; MARIANI, E.; SANSONI, P.; SANTONI, A.; VECCHIO, G.; WITKOWSKI, J. M.; CARUSO, C. Pathophysiology of ageing, longevity and age related diseases. **Immun. Ageing**, London, v.4, n.4, p.1-8, 2007.

BRYAN, N. S.; GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 43, p.645–57, 2007.

CAIRO, G; RECALCATI, S; PIETRANGELO, A; MINOTTI, G. The iron regulatory proteins: targets and modulators of free radical reactions and oxidative damage. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.32, n.12, 1237-43, 2002.

CAIRO, G.; RECALCATI, S. Iron-regulatory proteins: molecular biology and pathophysiological implications. **Expert Rev. Mol. Med.**, Cambridge, v. 9- 33, p.1-13, 2007.

CALADO, R. T.; ALBERTO, F.L.; FALCÃO, R.P. Metabolismo do ferro. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R.. **Hematologia**. Fundamentos e Prática, 1. ed., São Paulo: Atheneu, 2004. cap. 22, p.220.

CHAPMAN, A.L.; WINTERBOURN, C.C.; BRENNAN, S.O.; JORDAN T.W.; KETTLE, A.J. Characterization of non-covalent oligomers of proteins treated with hypochlorous acid. **Biochem. J.**, London, v.375, p. 33-40, 2003.

CHENILLOT, O.; HENNY, J.; STEINMETZ, J.; HERBETH, B.; WAGNER, C.; SIEST, G. High sensitivity C-reactive protein: biological variations and reference limits. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v. 38, n.10, p.1003-11, 2000.

CHOI, J.W. Sensitivity, Specificity, and Predictive Value of Serum Soluble Transferrin Receptor at Different Stages of Iron Deficiency. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v. 35, n.4, p-435-9, 2005.

CHUA, E.; CLAGUE, J.E.; SHARMA, A.K.; HORAN, M.A.; LOMBARD, M. Serum transferrin receptor assay in iron deficiency anaemia and anaemia of chronic disease in the elderly. **Q.J.M.**, Oxford, v.92, n.10, p. 587-594, 1999.

CONRAD, M.E.; UMBREIT, J.N.; MOORE, E. G. Iron absorption and transport. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v.318, n. 4, p.213-229, 1999.

COOK, J.D. The measurement of serum transferrin receptor. **Am. J. Med. Sci.**, Philadelphia, v. 318, n. 4, p. 269-76. 1999.

COOK, J.D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, London, v. 18, n.2, p. 319–332, 2005.

DEC, G. W. Anemia in Heart Failure. Time to Rethink Its Etiology and Treatment? **J. Am. Coll. Cardiol.**, New York, v. 48, n. 12, 2006.

DAYER, E.; DAYER, J.M.; ROUX-LOMBARD, P. Primer: the practical use of biological markers of rheumatic and systemic inflammatory diseases. **Nat. Clin. Pract. Rheumatol**, New York, v. 3, n.9, p.512-20, 2007.

DE DOMENICO, I.; MC VEY WARD, D.; KAPLAN, J. 2008. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, London, v.9, n.1, p.72-81, 2008.

DE MARTINIS, M.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; GINALDI, L. Inflamm-ageing and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Lett.**, Amsterdam, v.579, p.2035-2039, 2005.

DING, A.H.; NATHAN, C.F.; STUEHR, D.J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 141, n.7, p.2407-12, 1988.

DELLA BIANCA, V.; DUSI, S; NADALINI, K.A.; DONINI, M.; ROSSI, F. Role of 55- and 75-kDa TNF receptors in the potentiation of Fc-mediated phagocytosis in human neutrophils. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v.214, n.1, p.44, 1995.

DOMACHOWSKE, J. B. The role of nitric oxide in the regulation of cellular iron metabolism. **Biochem. Mol. Medicine**, Orlando, v. 60, p.1–7, 1997.

DROGE, W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. **Physiol. Rev.**, Washington, v.82, p. 47–95, 2002.

DROGE; SCHIPPER, H.M. Oxidative stress and aberrant signaling in aging and cognitive decline. **Aging Cell**, Oxford, v. 6, p.361–370, 2007.

EISENSTAEDT, R; PENNINX, B. W.; WOODMAN, R C. Anemia in the elderly: Current understanding and emerging concepts. **Blood Rev.**, Baltimore, v. 20, n.4, 213–226, 2006.

EISENSTEIN, R.S.; BLEMINGS, K.P. Iron regulatory proteins, iron responsive elements and iron homeostasis. **J. Nutr.**, London, v.128, p.2295-98, 1998.

EISERICH J. P.; PATEL R P.; O'DONNELL, V. B. Pathophysiology of nitric oxide and related species: free radical reactions and modification of biomolecules. **Mol. Aspects Med.**, Oxford, v. 19, p. 221-357, 1998.

EISERICH J. P.; HRISTOVA, M.; CROSS C. E.; JONES, A.D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, London, v. 391, n.22, p.393-7, 1998.

EL BENNA, J.; HAYEM, G.; DANG, P. M.; FAY, M.; CHOLLET-MARTIN, S.; ELBIM, C.; MEYER, O.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. NADPH oxidase priming and p47phox phosphorylation in neutrophils from synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis and spondylarthropathy. **Inflammation**, New York, v.26, p.273–278, 2002.

EZEKOWITZ, J.A.; MCALISTER, F.A.; ARMSTRONG, P.W. Insights From a Cohort of 12 065 Patients With New-Onset Heart Failure Anemia Is Common in Heart Failure and Is Associated With Poor Outcomes. **Circulation**, Philadelphia, v.107, p.223-225, 2003.

EKIZ, C.; AGAOGLU, L.; KARAKAS, Z.; GUREL, N; YALCIN, I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. **Hematol. J.**, London, v.5, p.579-583, 2005.

FAGNONI, F.F.; VESCOVINI, R.; PASSERI, G.; BOLOGNA, G.; PEDRAZZONI, M.; LAVAGETTO, G.; CASTI, A.; FRANCESCHI, C.; PASSERI, M.; SANSONI P. Shortage of circulating naive CD8 T cells provides new insights on immunodeficiency in aging. **Blood**, Washington, v. 95, p.2860–2868, 2000.

FERRUCCI, L.; GURALNIK, J. M.; BANDINELLI, S.; SEMBA, R. D.; LAURETANI, F.; CORSI, A.; RUGGIERO, C.; ERSHLER, W. B.; LONGO, D. L. Unexplained anaemia in older persons is characterized by low erythropoietin and low levels of pro-inflammatory markers. **Br. J. Haematol.**, Oxford, v. 136, n.6, p. 849–855, 2007.

FERRUCCI, L.; MAGGIO, M.; BANDINELLI, S.; BASARIA, S.; LAURETANI, F.; BLE, A.; VALENTI, G.; ERSHLER, W. B.; GURALNIK, J.M.; LONGO, D. L. Low Testosterone Levels and the Risk of Anemia in Older Men and Women. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 166, p.1380-1388, 2006.

FERRUCCI, L.; CORSI, A.; LAURETANI, F.; BANDINELLI, S.; BARTALI, B.; TAUB, D.D.; GURALNIK, J.M.; LONGO, D. L. The origins of age-related proinflammatory state. **Blood**, Washington, v.105, n.6, p.2294-2299, 2005.

FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G.P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.42, n.2, p.153-64, 2007.

FORTUNO, A.; OLIVAN, S.; BELOQUI, O.; JOSÉ, G.S.; MORENO, M.U.; DÍEZ, J.; ZALBA, G. Association of increased phagocytic NADPH oxidase-dependent superoxide production with diminished nitric oxide generation in essential hypertension. **J. Hypertens.**, New York, v.22, p.2169-75, 2004.

FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; SANSONI, P.; COSSARIZZA, A. The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. **Immunol. Today**, Amsterdam, v. 16, p.12–16. 1995.

FRANCESCHI, C.; BONAFA, M.; VALENSIN, S.; OLIVIERI, F.; DE LUCA, M.; OTTAVIANI, E.; DE BENEDICTIS, G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, New York, v. 908, p.244–254, 2000.

GANZ, T. Molecular Pathogenesis of Anemia of Chronic Disease. **Pediatr. Blood Cancer**, Hoboken, v. 46, p.554–557, 2006.

GANZ, T. Hepcidin—a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, London, v. 18, n. 2, pp. 171–182, 2005.

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

GINALDI, L.; STERBERG, H. The immune system in: **Physiological Basis of Aging and Geriatrics**, New York, pp.265-283, CRC Press, Timiras, P.S. Ed., third ed., 2003.

GIULIANI, N.; SANSONI, P.; GIRASOLE, G.; VESCOVINI, R.; PASSERI, G.; PASSERI, M.; PEDRAZZONI M. Serum interleukin-6, soluble interleukin-6 receptor and soluble gp130 exhibit different patterns of age- and menopause-related changes. **Exp. Gerontol.**, Tarrytown, v. 36, n.3, p.547–557, 2001.

GORDILHO, A.C.; OLIVEIRA, A.S.B.; DERNTL, A.M.; ALVS, A.L.; SOUZA, A.M.F.de; PRATES, A. Desafios a serem enfrentados no terceiro milênio pelo setor saúde na atenção integral ao idoso. Centro de Referência e Documentação sobre Envelhecimento, da Universidade Aberta da Terceira Idade - **UnATI**, Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ, Rio de Janeiro, 2000.

GROEMPING, Y.; RITTINGER, K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem. J.**, London, v. 386, p.401–416, 2005.

GOUGEROT-POCIDALO, M.A.; EL BENNA, J.; ELBIM, C.; CHOLLET-MARTIN, S.; DANG, M.C. Regulation of human neutrophil oxidative burst by pro- and anti-inflammatory cytokines. **J. Soc. Biol.**, Paris, v. 196, p.37–46. 2002.

GURALNIK, J.M.; ERSHLER, W.B.; SCHRIER, S. L.; PICOZZI, V. J. Anemia in the Elderly: A Public Health Crisis in Hematology. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, Washington, p.528-532, 2005.

GUYATT, G.H.; PATTERSON, C.; ALI, M; SINGER, J; LEVINE, M; TURPIE, I; MEYER, R. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly. **Am. J. Med.**, New York, v.88, p.205-209, 1990.

HAMPTON, M.B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, Washington, v.92, n.9, p.3007-3017, 1998.

HE, O.Y.; MASON, A.B.; NGUYEN, V.; MacGILLIVRAY, R.T.A.; WOODWORTH, R.C. The chloride effect is related to anion binding in determining the rate of iron release from the human transferrin N-lobe. **Biochem. J.**, New York, v. 350, p. 909-915, 2000.

HED, J. Methods for distinguishing ingested from adhering particles. **Methods Enzymol.**, New York, v.132, p.198-204, 1986.

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

HOLYOAKE, T.L.; STOTT, D. J.; MCKAY, P. J.; HENDRY, A.; MACDONALD, J. B.; LUCIE, N. P. Use of plasma ferritin concentration to diagnose iron deficiency in elderly patients. **J. Clin. Pathol.**, London, v.46, p.857-860, 1993.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Perfil dos idosos responsáveis pelo domicílio no Brasil 2000**. Estudos e pesquisas, informação demográfica e socioeconômica, Instituto brasileiro de geografia e estatística, Rio de Janeiro, n.9, 2002. Disponível em <www.ibge.org.br > Acesso em 15/01/2007.

JABLONSKA, E.; KILUK, M.; MARKIEWICZ, W.; JABLONSKI, J. Priming effects of GM-CSF, IFN-gamma and TNF-alpha on human neutrophil inflammatory cytokine production. **Melanoma Res.**, London, v.12, p.123-128. 2002.

JOOSTEN, E. Strategies for the laboratory diagnosis of some common causes of anaemia in elderly patients. Review. **Gerontology**, Basel, v.50, p.49-56, 2004.

KALACHE, A.; KELLER, I. "The greying world: a challenge for the 21 st century". **Sci Prog.**, New Haven, v. 83, n.1, 33-54. 2000.

KETTLE, A.J.; WINTERBOURN, C.C. Assays for the chlorination activity of myeloperoxidase. **Methods Enzymol.**, New York, v.233, p.502-512, 1994.

KIM, S; PONKA, P. Role of nitric oxide in cellular iron metabolism. **BioMetals**, Berlin, v. 16, p.125-135, 2003.

KIM, S; PONKA, P. Nitric Oxide-Mediated Modulation of Iron Regulatory Proteins: Implication for Cellular Iron Homeostasis. **Blood Cells Mol. Dis.**, Orlando, v. 29, n.3, p. 400-410, 2002a.

KIM, S.; PONKA, P. Nitrogen monoxide-mediated control of ferritin synthesis: Implications for macrophage iron homeostasis. **Cell Biology**, Philadelphia, v.99, n.19, p.12214-9, 2002b.

KOTAMRAJU, S.; TAMPO, Y.; KESZLER, A.; CHITAMBAR, C.R.; JOSEPH, J.; HAAS, A.L.; KALYANARAMAN, B. Nitric oxide inhibits H₂O₂-induced transferrin receptor-dependent apoptosis in endothelial cells: Role of ubiquitin-proteasome pathway. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v.100, n.19, p.10653-10658, 2003.

KOWANKO, I.C.; FERRANTE, A.; CLEMENTE, G.; YOUSSEF, P.P.; SMITH, M. Tumor necrosis factor priming of peripheral blood neutrophils from rheumatoid arthritis patients. **J. Clin. Immunol.**, New York, v. 16, 216–221, 1996.

KRAUSE, D.; MASTRO, A.M.; HANDTE, G.; SMICIKLAS-WRIGHT, H.; MILES, M.P.; AHLUWALIA, N. Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished women. **Mech. Ageing Dev.**, Lausanne, v.112, p. 43–57, 1999.

KRUSZEWSKI M. Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v. 531, n.1-2, p.81-92, 2003.

KURTOGLU, E.; UGUR, A.; BALTACI, A.K.; MOGOLKOC, R.; UNДАР, L. Activity of neutrophil NADPH oxidase in iron-deficient anemia. **Biol. Trace Elem. Res.**, London, v.96, p.109-15, 2003.

LIEU, P.T.; HEISKALA, M.; PETERSON, P.A.; YANG, Y. The roles of iron in health and disease. **Mol. Aspects Med.**, Bethesda, v.22, p.1-87, 2001.

LIPSCHITZ, D.; MITCHELL, C.; THOMPSON, C. The anemia of senescence. **Am. J. Hematol.**, New York, v.11, p.47-54, 1981.

LIPINSKI, P.; STARZYNSKI, R.R.; DRAPIER, J.C.; BOUTON, C.; BARTLOMIEJCZYK, T.; SOCHANOWICZ, B.; SMUDA, E.; GAJKOWSKA, A.; KRUSZEWSKI, M. Induction of iron regulatory protein 1 RNA-binding activity by nitric oxide is associated with a concomitant increase in the labile iron pool: implications for DNA damage. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, San Diego, v. 327, n.1, p.349-355, 2005.

LÓPEZ-HURTADO, M.; FLORES-MEDINA, S.; DIAZ-GARCIA F. J.; GUERRA-INFANTE F. M. Partial characterization of phagocytic activity in neutrophils of the nine-banded armadillo *Dasypus novemcinctus*. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, Amsterdam, v.106, n.3-4, p.269-75, 2005.

MARGETIC, S.; TOPIC, E.; DRAGICA, F.R.; KVATERNICK, M. Soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index in iron deficiency anemia and anemia in rheumatoid arthritis. **Clin. Chem. Lab. Med.**, Berlin, v.43, n.3, p.326-31, 2005.

MARKOVIC, M.; MAJKIC´-SINGH, N.; SUBOTA, V. Usefulness of soluble transferrin receptor and ferritin in iron deficiency and chronic disease. **Scand. J. Clin. Lab. Invest.**, Oslo, v. 65, p. 571–576, 2005.

MAST, A.E.; BLINDER, M.A.; GRONOWAKI, A.M.; CHUMLEY, C.; SCOTT M.G. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. **Clin. Chem.**, Washington, v. 44:45–51, 1998.

MC GRAW, T. E.; MAXFIELD, F.R. Human transferrin receptor internalization is partially dependent upon an aromatic amino acid on the cytoplasmic domain. **Cell Regulation**, Bethesda, v.1, 369-377, 1990.

MLADENKA, P.; SIMUNEK, T.; HUBL, M.; HRDINA, R. The role of reactive oxygen and nitrogen species in cellular iron metabolism. **Free Radic. Res.**, London, v. 40, n.3, p.263-272, 2006.

MUTZE, S.; HEBLING, U.; STREMMEL, W.; WANS, J.; ARNHOLD, J.; PANTOPOULOS, K.; MUELLER, S. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. **J. Biol. Chem.**, San Francisco, v.278, n.42, p.40542-549, 2003.

NAOUM, P. C. Eletroforese: técnicas e diagnósticos. In: NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias**. 2. ed. São Paulo: Livraria Editora Santos, 1999. cap. 4, p. 57–100.

NAPPI, A. J.; VASS, E. Interaction of iron with reactive intermediates of oxygen and nitrogen. **Dev. Neurosci.**, Basel, v.24, p.134-142, 2002.

NAUSEEF, W. M.; MALECH, H. L. Analysis of the peptide subunits of human neutrophil myeloperoxidase. **Blood**, Washington, v. 67, p.1504–1507, 1986.

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B.K.; GANZ, T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J. Clin. Invest.**, New Haven, v. 113, p.1271–1276, 2004.

OCKENE, I.S.; MATTHEWS, C.E.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M.; REED, G.; STANEK, E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. **Clin. Chem.**, Washington, v.47, n.3, p.:444-450, 2001.

ODEMIS, E.; KOCA, C.; KARADAG, A.; CATAL, F.; AYDIN, M.; TURKAY, S.; YIGITOGLU, R. Nitric oxide affects serum ferritin levels in children with iron deficiency. **Pediatr.Hematol. Oncol.**, Hagerstown, v.24-3, p.189-94, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Envelhecimento ativo**: uma política de saúde, 2005. Brasília. Organização Pan Americana de Saúde, 2005. 60p.

PANTOPOULOS, K.; HENTZE, M.W. Rapid responses to oxidative stress mediated by iron regulatory protein. **EMBO J.**, Oxford, v.14, p.2917-24, 1995.

PANTOPOULOS, K.; MUELLER, S.; ATZBERGER, A.; ANSORGE, W.; STREMMEL, W.; HENTZE, M.W. Differences in the regulation of iron regulatory protein-1 (IRP-1) by extra- and intracellular oxidative stress. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 272, n.15, p. 9802-9808, 1997.

PANTOPOULOS, K. Iron Metabolism and the IRE/IRP regulatory System. An Update. **Ann. N.Y.Acad. Sci.**, Washington, v.1012, p.1-13, 2004.

PENNINX, B.W.; GURALNIK, J.M.; ONDER, G.; FERRUCCI, L.; WALLACE, R.B.; PAHOR, M. Anemia and decline in physical performance among older persons. **Am. J. Med.**, New York, v. 115, n.2, p. 104–10, 2003.

PODREZ, E. A.; ABU-SOUD H. M.; HAZEN, S. L. Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v. 28, n. 12, p. 1717–1725, 2000.

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

QUINN, M.T.; GAUSS, K. A. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **J. Leukoc. Biol.**, New York, v.76, n.4, p.760-781, 2004.

RADI, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. **PNAS**, Washington, v.101, n.12, 4003-4008, 2004.

RAMOS, L.L.; POU, S.; BRITEGAN, B. E.; COHEN, M.S.; ROSEN, G. M. Spin trapping evidence for myeloperoxidase-dependent hydroxyl radical formation by human neutrophils and monocytes. **J. Biol.Chem.**, Baltimore, v. 267, p.8307-8312, 1992.

RECALCATI, S.; ALBERGUINI, A.; CAMPANELLA, A.; GIANELLI, U.; DE CAMILI, E.; CONTE, D.; CAIRO, G. Iron regulatory proteins 1 and 2 in human monocytes,

macrophages and duodenum: expression and regulation in hereditary hemochromatosis and iron deficiency. **Haematologica**, Pavia, v.91, p.303-10, 2006.

REIF, D.W.; SIMMONS, R.D. Nitric oxide mediates iron release from ferritin. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.283, p.537-541, 1990.

RIDKER, P.M. Inflammation in atherothrombosis: how to use high sensitivity C-reactive protein (hsCRP) in clinical practice. **Am. Heart Hosp. J.**, Darien, v.2, n.1, p.4-9, 2004.

RIMON, E.; LEVY, S.; SAPIR, A.; GELZER, G.; PELED, R.; ERGAS, D.; STHOEGER, Z. Diagnosis of iron deficiency anemia in the elderly by transferrin receptor-ferritin index. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 162, p.445-449, 2002.

ROBERTS, W.L.; MOULTON, L.; LAW, T.C.; FARROW, G.; COOPER-ANDERSON, M.; SAVORY, J.; RIFAI, N. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications: Part 2. **Clin. Chem.**, Washington, v.47, p.418-425, 2001.

ROSEN, G. M.; POU, S.; RAMOS, C. L.; COHEN, M. S.; BRITIGAN, B. E. Free radicals and phagocytic cells. **Faseb J.**, Bethesda, v.9 p.200-9, 1995.

RYTER, S. W.; TYRRELL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radic. Biol. Med.**, Tarrytown, v.28, n.2, p.289-309, 2000.

SANSONI, P.; VESCOVINI, R.; FAGNONI, F.; BIASINI, C.; ZANNI, F.; ZANLARI, L.; TELERA, A.; LUCCHINI, G.; PASSERI, G.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C.; PASSERI, M. The immune system in extreme longevity. **Exp. Gerontol.**, Tarrytown, v.43, n.2, p.61-65, 2008.

SCHOPFER, F.J.; BAKER, P.R.S.; FREEMAN, B.A. NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response? **Trends Biochem. Sci.**, Amsterdam, v.28, n.12, p.646-654, 2003.

SHALABY, M. R.; AGGARWAL, B. B.; RINDERKNECHT, E.; SVEDERSKY, L.; FINKLE, B. S.; JR PALLADINO, M. A. Activation of human polymorphonuclear neutrophil functions by interferon- and tumor necrosis factors. **J. Immunol.**, Baltimore, v. 135, n.3, p.2069-2073, 1985.

SHEPPARD, R. F.; KELHER, M.R.; MOORE, E.E.; MCLAUGHLIN, N.J.D.; BANERJEE, A.; SILLIMAN, C.C. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation **J. Leukoc. Biol.**, New York, v.78, p.1025-1042, 2005.

SILVERBERG, D.S.; WEXLER, D.; IAINA, A. The importance of anemia and its correction in the management of severe congestive heart failure. **Eur. J. Heart Fail.**, Amsterdam, v.4, n.6, p.:681-6, 2002.

SMITH, D.L. Anemia in the elderly. **Am. Fam. Physic.**, Kansas City, v 62, n.7, p.1565–1572, 2000.

SOUZA-JUNIOR, J.L.; IANNI, B.M.; MADY, C. Efeitos cardiovasculares da anemia. **Soc. Cardiol. Estado de São Paulo**, São Paulo, v.13, n.4, p.404-408, 2003.

STEWART, C.C.; LEHNERT, B.E.; STEINKAMP, J.A. In vitro and in vivo measurement of phagocytosis by flow cytometry. **Methods Enzymol.**, New York, v.132, p.183-192, 1986.

SUOMINEN, P.; PUNNONEN, K.; RAJAMAKI, A.; IRJALA, K. Serum Transferrin Receptor and Transferrin Receptor-Ferritin Index Identify Healthy Subjects with Subclinical Iron Deficits. **Blood**, Washington, v. 92- 8, p. 2934-39, 1998.

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

TANG, Y.D.; KATZ, S.D. Anemia in Chronic Heart Failure Prevalence, Etiology, Clinical Correlates, and Treatment Options. **Circulation**, Philaphelphia, v.113, p.2454-2461, 2006.

TERROVITIS, J.V.; ANASTASIOU-NANA, M.I.; ALEXOPOULOS, G.P.; TSOLAKIS, E.J.; MARGARI, Z.J.; DRAKOS, S.G.; TSAGALOU, E.P.; PAPAZOGLU, P.; EFENTAKIS, S.; NANAS, J.N. Prevalence and prognostic significance of anemia in patients with congestive heart failure treated with standard vs high doses of enalapril. **J. Heart Lung Transplant.**, St. Louis, v.25, n.3, p.333-338, 2006.

TESTA, U. Recent developments in the understanding of iron metabolism. **Hematol. J.**, London, v. 3, n. 2, p. 63-89, 2002.

THEURL, I.; THEURL, M.; SEIFERT, M.; MAIR, S.; NAIRZ, M.; RUMPOLD, H.; ZOLLER, H.; BELLMANN-WEILER, R.; NIEDEREGGER, H.; TALASZ, H.; WEISS, G. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. **Blood**, Washington, v.111, n. 4, 2008.

THOMAS, C.; KIRSCHBAUM, A.; BOEHM, D.; THOMAS, L. The diagnostic plot: a concept for identifying different states of iron deficiency and monitoring the response to epoetin therapy. **Med. Oncol.**, Totowa, v. 23-1, p.23-36, 2006.

TORTI, F.M.; TORTI, S.V. Regulation of ferritin genes and protein. **Blood**, Washington, v.99-10, p. 3505-16, 2002.

UETRECHT, J.P. Reactive metabolites and agranulocytosis. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v.57, p.83-88, 1996.

UMBREIT, J. Iron deficiency: a concise review. **Am. J. Hematol.**, New York, v.78; p.225-231, 2005.

VALENCIA, A. "**Envelhecimento** — A melhor idade ou a terceira idade? Implicações para a sociedade latino-americana". Palestra realizada em 2006. Disponível em <www.opas.org.br.> Acesso em 26/ jul./ 2007.

VAN DALEN, C.J.; WINTERBOURN, C.C.; SENTHILMOHAN, R.; KETTLE, A.J. Nitrite as a substrate and inhibitor of myeloperoxidase. Implications for nitration and hypochlorous acid production at sites of inflammation. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 275, n.16, p.11638-11644, 2000.

VAN DER MEER, P.; LIPSIC E.; WESTENBRINK B.D.; VAN DE WAL, R.M.; SCHOEMAKER, R.G.; VELLENGA, E.; VAN VELDHUISEN D.J.; VOORS, A.A.; VAN GILST, W.H. Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysylproline partially explain the occurrence of anemia in heart failure. **Circulation**, Philadelphia, v.112, n.12, p.1743–1747, 2005.

VANNI, D.S.; HORSTMANN, B.; BENJO, A.M.; DAHER, J.P.L.; KANAAN, S.; SLEIMAN, M. Óxido nítrico: inibição das plaquetas e participação na formação do trombo. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v.43, n.3, p.181-9, 2007.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mech. Ageing Dev.**, Lausanne, v.128, p.83-91, 2007.

VONDRACEK, J. Effects of recombinant rat tumor necrosis factor- α and interferon- γ on respiratory burst of rat polymorphonuclear leukocytes in whole blood. **Folia Biol.**, Prague, v.43, p.115-121, 1997.

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

WEISS, G. Modification of iron regulation by the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, London, v.18, n.2, p.183-201, 2005.

WEISS, G.; GOODNOUGH, L.T. Anemia of chronic disease. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.352, p.1011–23, 2005.

WEXLER, D.; SILVERBERG, D.; BLUM, M.; SHEPS, D.; KEREN, G.; WOLLMAN, Y., et al. Anaemia as a contributor to morbidity and mortality in congestive heart failure. **Nephrol. Dial. Transplant.**, Berlin, v. 20, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global Forum for Health Research: The10/90 Report on Health Research**. Geneva, World Health Organization, 2000. Disponível em <www.who.it > Acesso em 15/jan./2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Iron Deficiency Anaemia, Assessment, Prevention, and Control**. A guide for programme managers, 2001. In: Disponível em <www.who.it > Acesso em 26/nov./2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Nutritional Anaemias**. Report of a WHO Scientific Group. Geneva, World Health Organization, 1968. (Technical Report Series, n.405). Disponível em <www.who.it > Acesso em 15/jan./2007.

WIANS, F.H.; URBAN, J.E.; KEFFER, J.H.; KROFT, S.H. Discriminating between iron deficiency anemia and anemia of chronic disease using traditional indices of iron status vs transferrin receptor concentration. **Am. J. Clin. Pathol.**, Philadelphia, v.115, n.1, p. 112-118, 2001.

WIEL, A. V. Anemia in critically ill patients. **Eur. J. Intern. Med.**, Basingstoke, v.15, p.481-486, 2004.

WINTERBOURN, C.; Biological reactivity and biomarkers of the neutrophil oxidant, hypochlorous acid. **Toxicology**, Amsterdam, v. 181–182, p.223–227, 2002.

WIHOLM, B.E.; EMANUELSSON, S. Drug-related blood dyscrasias in a Swedish reporting system, 1985-1994. **Eur. J. Haematol.**, Copenhagen, v.57, p.42-46, 1996.

XIAO D.S.; QIAN Z.M. Plasma nitric oxide and iron concentrations exercised rats are negatively correlated. **Mol. Cell Biochem.**, Hague, v. 208, p. 163–166, 2000.

XIMENES, V.F.; PAINO, I.M.M.; FARIA-OLIVEIRA, O.M.M. DE; FONSECA, L.M. DA; BRUNETTI, I.L. Indole ring oxidation by activated leukocytes prevents the production of hypochlorous acid. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, São Paulo, v.38, p. 1575-1583, 2005.