UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias

JACQUELINE DA SILVA GUIMARÃES

Ribeirão Preto
2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias

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

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientada: Jacqueline da Silva Guimarães

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza

Versão corrigida da Tese de Doutorado Direto apresentada ao Programa de Pós-Graduação Biociências Aplicadas à Farmácia em 15/12/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Guimarães, Jacqueline da Silva
“Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias”.
Ribeirão Preto, 2014
125p.; il. 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Biociências Aplicadas à Farmácia.
Orientador: Souza, Ana Maria de.

1. Talassemias 2. Metabolismo do ferro 3. Hepcidina 4. Eritropoese

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jacqueline da Silva Guimarães

Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias.

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de
Souza

Aprovado em: 15/12/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Intituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho a Deus pela vida e perseverança; aos meus pais João e Brasilina pela educação; a minha irmã Juliana pela parceria; aos meus familiares e amigos que me apoiaram. E a todos, pelos diferentes tipos de amor.

Agradecimentos

À Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza por ter aceitado ser minha orientadora, me dando a oportunidade de aprimorar meus conhecimentos científicos. Agradeço todo o trabalho, dedicação, carinho, amizade e exemplo que enriqueceram minha vida;

Ao Dr. Stefano Rivella pela colaboração inestimável na concepção e execução deste trabalho, abrindo as portas do seu laboratório, o que me permitiu oportunidade de aprimorar meus conhecimentos no exterior.

À mestranda Juçara Gastaldi Cominal pela colaboração e parceria. Agradeço a dedicação, carinho e a amizade que cultivamos ao longo dos anos;

À Prof^a. Dr^a. Ana Cristina Silva Pinto, médica hematologista colaboradora deste trabalho.

Aos professores doutores Ana Lúcia Costa Darini, Ana Patrícia Yatsuda Natsui, Andreia Machado Leopoldino, Eliane Candiani Arantes Braga, Lucia Helena Faccioli, Luciana Simon Pereira Crott, Marcelo Dias Baruffi, Maria Regina Torqueti, por colocarem seus laboratórios e equipamentos à nossa disposição, garantindo a execução deste trabalho;

Aos colegas do programa de Biociências Aplicadas à Farmácia pelas sugestões técnicas, em especial, Dr. Camillo Andrade, Dr. Luiz Miguel, Ms. Mariana Bronzon;

Aos pesquisadores colaboradores dos Estados Unidos da América Dr^a. Yelena Ginzburg, Dr^a. Vijay Nandi, Dr^a. Gordana Olbina e Dr. Mark Westerman pela colaboração;

Aos pesquisadores do laboratório The Strauss Thalassemia, do Departamento Pediatric Hematology-Oncology, da Weill Medical College of Cornell University, New York, NY, USA pelo auxílio sobre as técnicas e equipamentos.

À Jennifer M. Yokoya e a Solange A. F. Bocardo pela dedicação e serviço de apoio;

À Edna Barizon e Analuiza Costa, do Serviço de Análises Clínicas da FCFRP-USP, pela colaboração na realização das dosagens de ferritina e proteína C reativa;

Aos voluntários que aceitaram participar do estudo e pela confiança depositada em nosso trabalho;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro no Brasil;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro no exterior;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente pela concretização desse trabalho e meu aprimoramento científico.

Epígrafe

“Todos nós sabemos alguma coisa.
Todos nós ignoramos alguma coisa.
Por isso, aprendemos sempre.”

Paulo Freire

RESUMO

GUIMARÃES, J. S. **Alterações do metabolismo do ferro nas talassemias**. 2014. 122f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

As síndromes talassêmicas (α - e β -talassemia) são as desordens mais comuns e frequentes associadas com eritropoese ineficaz. O desbalanço na produção das cadeias α - e β -globinas resulta no comprometimento da produção de eritrócitos, em anemia e aumento de progenitores eritroides no sangue periférico. Enquanto os pacientes homozigóticos afetados por essas desordens demonstram alterações características dos parâmetros relacionados a eritropoese, a relação entre grau de anemia, eritropoese alterada e disfunção do metabolismo de ferro ainda não foram investigados nos indivíduos com α^+ -talassemia heterozigótica ou β^+ -talassêmia. Duzentos e vinte seis indivíduos (75 do gênero feminino e 151 do gênero masculino) foram recrutados e divididos em 5 grupos: Controle (n=28), doadores de sangue regulares (DSR, n=23), α^+ -talassemia heterozigótica (TAT, n=14), β^+ -thalassemia (traço β -talassêmico, TBT, n=20) e β^0 -talassemia, (β -talassemia maior, BTM, n=27). As amostras foram analisadas para parâmetros hematológicos (Micros ABX 60); ferro sérico, capacidade total de ligação ao ferro e saturação de transferrina por método colorimétrico (Pointe Scientific, Inc., Canton, MI, USA), ferritina e proteína C-reativa ultra sensível por imunoensaio (Immulite 1000); receptor solúvel de transferrina, eritropoetina, fator de diferenciação do crescimento 15 (R&D Systems) e hepcidina (Intrinsic LifeSciences, La Jolla, CA) por ELISA. As razões sTfR/log ferritina e (hepcidina/ferritina)/sTfR foram calculadas para avaliar o metabolismo do ferro. sTfR/log ferritina pode distinguir depleção dos estoques de ferro de eritropoese deficiente de ferro, enquanto (hepcidina/ferritina)/sTfR pode avaliar os estímulos contrários (disponibilidade de ferro e atividade eritropoética) que controlam a síntese de hepcidina e a absorção de ferro, na ausência de estímulos inflamatórios. Foi demonstrado que TAT teve significativa redução da hepcidina e aumento do receptor solúvel de transferrina, com parâmetros hematológicos relativamente normais. Em contraste, todos os parâmetros hematológicos de TBT foram significativamente diferentes do Controle, incluindo aumento dos níveis do receptor solúvel de transferrina, ferritina, eritropoetina e fator de diferenciação do crescimento 15. Essas alterações em ambos os grupos sugerem um balanço alterado entre eritropoese e metabolismo de ferro. Os índices sTfR/log ferritina e (hepcidina/ferritina)/sTfR estão, respectivamente, aumentado e reduzido comparados ao Controle, proporcional a severidade de cada grupo talassêmico. Em conclusão, destacamos que, pela primeira vez, foram descritas alterações no metabolismo de ferro em indivíduos com α^+ -talassemia heterozigótica. Esses dados demonstram que, no contexto da saúde pública, são necessários identificação e acompanhamento dos portadores de α^+ -talassemia.

Palavras-chave: talassemia, hepcidina, eritropoese, metabolismo do ferro, fator de diferenciação do crescimento 15, ferritina, receptor solúvel de transferrina e eritropoetina.

ABSTRACT

GUIMARÃES, J. S. **Changes of iron metabolism in thalassemia**. 2014. 122f. Thesis (Doctor's Degree). School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto – University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2014.

The thalassemia syndromes (α - and β -thalassemia) are the most common and frequent disorders associated with ineffective erythropoiesis. Imbalance of α - or β -globin chain production results in impaired red blood cell synthesis, anemia and more erythroid progenitors in the blood stream. While patients affected by these disorders show definitive altered parameters related to erythropoiesis, the relationship between the degree of anemia, altered erythropoiesis and dysfunctional iron metabolism have not been investigated in both carriers of α -thalassemia and β -thalassemia. 226 subjects (75 females and 151 males) were recruited to this study and divided in 5 groups: Control (n=28), repeat blood donors (DSR, n=23), α^+ -thalassemia heterozygous carriers (TAT, n=14), β^+ -thalassemia (β -thalassemia trait, TBT, n=20) and β^0 -thalassemia, (β -thalassemia major, BTM, n=27). Samples were tested for hematological parameters (Micros ABX 60); serum iron, total iron binding capacity, and transferrin saturation by the colorimetric method (Pointe Scientific, Inc., Canton, MI, USA), ferritin and high sensitive C-reactive protein by immunoassay (Immulite 1000); soluble transferrin receptor, erythropoietin and growth differentiation factor 15 (R&D Systems) and hepcidin (Intrinsic LifeSciences, La Jolla, CA) by ELISA. Were calculated the ratios sTfR/log ferritin and (hepcidin/ferritin)/sTfR to evaluate iron metabolism. sTfR/log ferritin can distinguish storage iron depletion from iron-deficient erythropoiesis, while (hepcidin/ferritin)/sTfR can be utilized to explore and quantify the opposing forces (i.e. iron availability and erythropoietic activity) regulating hepcidin synthesis and iron absorption in absence of inflammatory stimuli. We demonstrate that TAT have a significantly reduced hepcidin and increased soluble transferrin receptor levels but relatively normal hematological findings. In contrast, TBT have all hematological parameters significantly different from controls, including increased soluble transferrin receptor, ferritin, erythropoietin and growth differentiation factor 15 levels. These changings in both groups suggest an altered balance between erythropoiesis and iron metabolism. The indexes sTfR/log ferritin and (hepcidin/ferritin)/sTfR are respectively increased and reduced relative to controls, proportional to the severity of each thalassemia group. In conclusion, we emphasize that, for the first time in the literature, subjects with heterozygous α^+ -thalassemia have altered iron metabolism. Our data demonstrate that within the context of public health, identification and monitoring of patients with α^+ -thalassemia are needed.

Keywords: thalassemia, hepcidin, erythropoiesis, iron metabolism, growth differentiation factor 15, ferritin, soluble transferrin receptor and erythropoietin.

RESUMEN

GUIMARÃES, J. S. **Los cambios del metabolismo del hierro en la talasemia.** 2014. 122f. Tesis (Doctorado). Facultad de Ciencias Farmacéuticas Ribeirão Preto - Universidad de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Los síndromes talasémicos (α - y β -talasemia) son los trastornos más comunes y frecuentes asociados con la eritropoyesis ineficaz. El desequilibrio en la producción de cadenas de las α - y β -globinas resulta en la producción alterada de eritrocitos en la anemia y el aumento de los progenitores eritroides en la sangre periférica. Mientras que los pacientes homocigotos afectados por estos trastornos demuestran cambio característico de los parámetros relacionados con la eritropoyesis, la relación entre el grado de anemia, la eritropoyesis alterada y disfunción del metabolismo de hierro aún no han sido investigados en los sujetos heterocigotos para α^+ -talasemia o con β^+ -talasemia. Doscientas veinte seis personas (75 mujeres y 151 hombres) fueron reclutados y se dividieron en 5 grupos: control (n=28), los donantes de sangre regulares (DSR, n=23), α^+ -talasemia heterocigota (TAT, n=14), β^+ -talasemia (rasgo de β -talasemia, TBT, n=20) y β^0 -talasemia (β -talasemia mayor, BTM, n=27). Se analizaron las muestras para los parámetros hematológicos (ABX Micros-60); hierro sérico, capacidad total de unión del hierro y la saturación de transferrina por colorimetría (Pointe Scientific, Inc., Canton, MI, EE.UU.), la ferritina y la proteína C-reactiva ultrasensible por inmunoensayo (Immulite 1000); receptor de transferrina soluble, eritropoyetina, el factor de diferenciación del crecimiento 15 (R & D Systems) y la hepcidina (LifeSciences intrínsecos, La Jolla, CA) por ELISA. Se calculó las razones sTfR/log ferritina y (hepcidina/ferritina)/sTfR para evaluar el metabolismo del hierro. sTfR / log ferritina puede distinguir el agotamiento de hierro de la eritropoyesis deficiente en hierro, mientras que (hepcidina/ferritina)/ sTfR se puede evaluar los estímulos opuestos, almacenamiento de hierro y la actividad eritropoyética, que controlan la síntesis de hepcidina en ausencia de los estímulos inflamatorios. Se demostró que TAT había reducido significativamente la hepcidina y aumentado el receptor de transferrina soluble, mientras los parámetros hematológicos estaban relativamente normales. En contraste, todos los parámetros hematológicos de TBT fueron significativamente diferentes del control, incluyendo aumento de los niveles de receptor de transferrina soluble, ferritina, eritropoyetina y del factor de diferenciación del crecimiento 15. Estos cambios en ambos grupos sugieren un equilibrio alterado entre la eritropoyesis y el metabolismo de hierro. Los índices sTfR/log ferritina y (hepcidina/ferritina)/sTfR se incrementa y reduce, respectivamente, en comparación con el control, proporcional a la gravedad de la talasemia en cada grupo. En conclusión, podemos destacar que, por primera vez, describimos los cambios en el metabolismo del hierro en personas con α^+ -talasemia heterocigótica. Estos datos demuestran que en el contexto de la salud pública, la identificación y el seguimiento de los pacientes con α^+ -talasemia son requeridos.

Palabras claves: talasemia, hepcidina, eritropoyesis, metabolismo del hierro, factor de diferenciación del crecimiento 15, ferritina, receptor de transferrina soluble y eritropoyetina.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Absorção de ferro no enterócito	03
Figura 2. Estrutura molecular da transferrina-diférrica	04
Figura 3. Estrutura molecular do domínio extracelular do receptor de transferrina 1.....	05
Figura 4. Ciclo do receptor de transferrina	06
Figura 5. Regulação da expressão gênica de hepcidina	10
Figura 6. Estruturas quaternárias da hemoglobina.....	13
Figura 7. Genes da hemoglobina humana nos cromossomos 16 e 11	14
Figura 8. Deleções que causam α^+ -talassemia	18
Figura 9. Exemplos de eletroforese de hemoglobina.....	27
Figura 10. Exemplo de eletroforese de DNA em gel de agarose.....	29
Figura 11. Exemplo de eletroforese de transferrina	31
Figura 12. Fluxograma dos experimentos realizados no Brasil	33
Figura 13. Fluxograma dos experimentos realizados nos Estados Unidos da América.....	34
Figura 14. Distribuição dos sujeitos da pesquisa segundo a idade e o gênero.....	36
Figura 15. Diferença de idade log-transformada entre os grupos de estudo	38
Figura 16. Distribuição das frações de transferrina nos grupos de estudo.....	41
Figura 17. Correlação entre razão hepcidina/ferritina e o receptor solúvel de transferrina	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação hematológica dos grupos de estudo	39
Tabela 2 – Status férrico dos grupos de estudo	40
Tabela 3 – Frações de Transferrina dos grupos de estudo	42
Tabela 4 – Avaliação da eritropoese dos grupos de estudo	42
Tabela 5 – Avaliação da hepcidina dos grupos de estudo	43
Tabela 6 – Correlação entre hepcidina e fatores potenciais que influenciam sua síntese em cada grupo de estudo.....	44
Tabela 7 – Correlação entre GDF15 e fatores potenciais que influenciam a eritropoese em cada grupo de estudo.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%Tsat	Saturação de transferrina
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Apo-Tf	Apo-transferrina
BMP	<i>Bone Morphogenetic Protein</i> (Proteína Morfogenética Óssea)
BMPR	<i>Bone Morphogenetic Protein Receptor</i> (Receptor da proteína morfogenética óssea)
BTM	Grupo de estudo β^0 -talassemia, clinicamente classificado como β -talassemia maior
DCYTB	<i>Duodenal Cytochrome B</i> (Citocromo b duodenal ferroxidase)
DMT-1	<i>Divalent Metal Transporter-1</i> (Proteína transportadora de metal divalente)
DSR	Grupo de estudo Doadores de Sangue Regulares.
Epo	Eritropoetina
EpoR	Receptor de eritropoetina
Fe-Tf	Transferrina monoférrica com átomo de ferro ligado à porção N-terminal
Fe ₂ -Tf	Transferrina diférrica ou holo-transferrina
Fpn	Ferroportina
GDF15	<i>Growth Differentiation Factor 15</i> (Fator de diferenciação do crescimento 15)
GDF15R	<i>Growth Differentiation Factor 15 Receptor</i> (Receptor do fator de diferenciação do crescimento 15)
HAMP	<i>Hepcidin Antimicrobial Peptide</i> (Gene responsável pela codificação da proteína hepcidina)
Hb	Hemoglobina
HCP1	<i>Heme Carrier Protein 1</i> (Proteína transportadora de heme)
Hep	Hepcidina
HFE	Proteína de hemocromatose humana (A nomenclatura é derivada do inglês H <i>high</i> e latim FE ferro)
HIF	<i>Hypoxia-inducible factor</i> (Fator indutor de hipóxia)
HIF2 α	<i>Hypoxia-inducible factor-2-alpha</i> (Fator indutor de hipóxia 2 α)
Hjv	Hemojuvelina
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
Jak2	<i>Janus kinase 2</i>
R-SMAD	Receptor da família de proteínas SMAD

sHjv	Hemojuvelina solúvel
SMAD	Grupo de proteínas intracelulares subclassificadas em ordem numérica responsável pela transdução de sinal de TGF- β no núcleo onde ativam genes de transcrição. O nome é uma combinação de duas proteínas homólogas de <i>C. elegans</i> (SMA) e <i>drosophila</i> (MAD).
STAT3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3</i> (Transdutor de sinal e ativador de transcrição)
sTfR	Receptor de transferrina solúvel
TAT	Grupo de estudo α^+ -talassemia heterozigota
TBT	Grupo de estudo β^+ -talassemia, clinicamente traço β -talassêmico
Tf	Transferrina
Tf-Fe	Transferrina monoférrica com átomo de ferro ligado à porção C-terminal
TfR	Receptor de transferrina
TfR1	Receptor de transferrina - 1
TfR2	Receptor de transferrina - 2
TGF β	<i>Transforming Growth Factor beta</i> (Fator de transformação do crescimento beta)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral – alfa
TMPRSS6	<i>Transmembrane protease serine 6</i>
WHO	World Health Organization (Organização Mundial de Saúde)

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
Å	Ångström
β	Beta
γ	Gama
δ	Delta
ε	Épsilon
ζ	Zeta
™	Trademark
®	Marca Registrada

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Abstracto	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
Lista de símbolos	viii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Metabolismo do ferro	02
1.2 Hepcidina: síntese e catabolismo	08
1.3 Desordens na síntese de hemoglobina.....	11
1.3.1 Deficiência de ferro	11
1.3.2 Hemoglobinopatias	12
1.3.2.1 α -talassemias	16
1.3.2.2 β -talassemias	18
2. OBJETIVOS	21
2.1 Geral	22
2.2 Específicos.....	22
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	23
3.1 Ética em Pesquisa	24
3.2 Casuística	24
3.3 Coleta do Material	25
3.4 Avaliação hematológica	26
3.5 Extração de DNA	26
3.6 Determinações qualitativa e quantitativa das frações de hemoglobina	26
3.7 Caracterização dos pacientes com α^+ -talassemia.....	28
3.8 <i>Status</i> férrico	29
3.8.1 Ferro, CTLF e saturação de transferrina.....	29
3.8.2 Ferritina sérica	29
3.8.3 Receptor de transferrina solúvel	29
3.8.4 Índice sTfR/log ferritina	30
3.8.5 Frações de transferrina sérica	30
3.9 Proteína C Reativa	31
3.10 Avaliação da Eritropoese.....	32
3.10.1 Eritropoetina	32
3.10.2 Fator de diferenciação de crescimento 15	32
3.11 Hepcidina.....	32
3.12 Análise estatística	32
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO	46
5.1 Avaliação hematológica	48
5.2 <i>Status</i> férrico	49

5.3 Avaliação da eritropoese	51
5.4 Avaliação da hepcidina	51
5.5 Correlações	53
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS.....	59
 APÊNDICES	 73
Apêndice A – Parâmetros de normalidade	74
Apêndice B – Eletroforese de hemoglobina do grupo β^+ -talassemia	75
Apêndice C – Resultados da avaliação hematológica.....	76
Apêndice D – Resultados das avaliações do metabolismo do ferro e da eritropoese	97
 ANEXOS	 104
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP.....	105
Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP.....	106
Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	107

1. INTRODUÇÃO

Anemia ferropriva é indicadora de uma pobre nutrição e saúde. Afeta 1,62 bilhões de pessoas no mundo tendo uma prevalência de 24,8%. É mais prevalente entre crianças pré-escolares (47,4%), menos prevalente em homens (12,7%) e 468,4 milhões de mulheres não grávidas apresentam anemia (WHO, 2008).

As desordens da síntese de hemoglobina (Hb) estão entre as principais causas de anemia e compreendem a deficiência de ferro, resultante da falta desse elemento por um longo período, e as hemoglobinopatias, hemoglobinas variantes e talassemias, que podem causar anemia e em alguns casos sobrecarga de ferro.

Anemia microcítica é a forma mais comumente encontrada na prática médica. A deficiência nutricional de ferro e traço β -talassêmico são as causas primárias em pediatria. A anemia microcítica hipocrômica pode resultar de defeitos nos genes da globina, na síntese do heme, na disponibilidade de ferro ou na aquisição de ferro pelos precursores eritroides (IOLASCON; DE FALCO; BEAUMONT, 2009).

O metabolismo do ferro e a eritropoese estão essencialmente ligados. Eritropoese requer a biossíntese coordenada do heme e das cadeias globínicas para produzir a hemoglobina durante a diferenciação do precursor eritroide. A eritropoetina está aumentada em condições que requerem aumento na síntese de eritrócitos (GINZBURG; RIVELLA, 2011).

1.1 Metabolismo do Ferro

O ferro é um micronutriente vital para homeostase celular sendo requerido, na proliferação e diferenciação celular, cadeia respiratória e transferência de elétrons, regulação gênica e na resposta imune celular. Por ser um componente essencial na síntese de hemoglobina, mioglobina, citocromos e outras enzimas envolvidas na oxidação e redução de substratos biológicos, seu metabolismo deve ser minuciosamente regulado, pois não há nenhum mecanismo fisiológico de excreção de ferro. Seu excesso pode gerar espécies reativas de oxigênio produzindo dano, morte celular e acúmulo nos tecidos (ANDREWS, 2005; GANZ, 2007; WESSLING-RESNICK, 2010).

Em média, um homem adulto possui 4g de ferro sendo 2g está na forma de hemoglobina, 1g estocado predominantemente no fígado e o restante na forma de mioglobina e outras proteínas constituídas de ferro. Cerca de 1 a 2 mg de ferro são perdidos todos os dias pela descamação do epitélio do trato gastrointestinal, descamação da pele e, nas mulheres, pela menstruação. Essa pequena perda é compensada pela dieta normal que, apesar de estar

em torno de 20 mg de ferro diários no ocidente, somente 1 a 2 mg são absorvidos, variando segundo necessidade do organismo (GANZ, 2007).

O ferro é obtido de duas fontes principais: dieta e reciclagem de eritrócitos senescentes pelos macrófagos. A absorção de ferro em humanos é principalmente regulada pelos estoques de ferro e taxa da eritropoese.

Nos enterócitos, o ferro inorgânico (Fe^{3+}) da dieta é reduzido à forma ferrosa (Fe^{2+}) pela citocromo b duodenal (DCYTB, do inglês Duodenal Cytochrome B) sendo então absorvido pela proteína transportadora de metal divalente (DMT-1, do inglês Divalent Metal Transporter-1), que também transporta manganês (Mn^{2+}), cobalto (Co^{2+}), cobre (Cu^{2+}) e zinco (Zn^{2+}). O ferro heme proveniente da carne vermelha é absorvido no enterócito pela proteína transportadora do heme (HCP1, do inglês Heme Carrier Protein-1) sendo liberado da protoporfirina pela ação da hemeoxigenase. Em ambas as situações, o ferro absorvido é armazenado na forma de ferritina ou liberado do enterócito para o sangue pela ferroportina (Fpn) (Figura 1).

Figura 1 – Absorção de ferro no enterócito. Adaptada de CHUA et al. The regulation of cellular iron metabolism. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.**, v.44, n.5-6, p.413-459, 2007.

DMT1 – transportador de metal divalente 1; DCYTB – citocromo b duodenal ferroredutase; FPN – ferroportina; HCP1 – proteína carreadora do grupo heme 1; Tf – transferrina; $\text{Fe}_2\text{-Tf}$ – transferrina diférrica.

Nos macrófagos do baço e medula óssea e nas células de Küpffer no fígado, a fagocitose e a degradação de eritrócitos senescentes representam uma fonte importante de ferro, suficientes para manter as necessidades diárias. Assim como nos enterócitos, o ferro nos macrófagos pode ser estocado como ferritina ou ser exportado pela Fpn (CHUNG; WESSLING-RESNICK, 2003; KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003; MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

A liberação de ferro na circulação ocorre na forma ferrosa (Fe^{2+}), sendo então oxidado para forma férrica (Fe^{3+}) pela hefaestina ou ceruloplasmina sérica, visto que a transferrina tem afinidade pelo ferro na forma férrica (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006).

Principal proteína plasmática que se liga ao ferro, com alta afinidade, e ao manganês, cobalto, cobre e cádmio, com baixa afinidade, a transferrina (Tf) transporta o ferro aos locais de uso e estoque. Ela possui dois sítios de ligação, ligando um átomo de ferro em cada; assim, quatro formas de Tf podem ser encontradas no plasma: apo-transferrina (apo-Tf ou Tf) que não contém átomos de ferro, transferrina-monoférrica cujo Fe está ligado à porção N-terminal (Fe-Tf), transferrina-monoférrica cujo Fe está ligado à porção C-terminal (Tf-Fe) e transferrina-diférrica ($\text{Fe}_2\text{-Tf}$) (Figura 2). Em condições fisiológicas, aproximadamente 30-40% desses locais de ligação estão ocupados; em casos de sobrecarga de ferro como hemocromatose genética ou repetidas transfusões sanguíneas em pacientes com β -talassemia, a transferrina pode estar completamente saturada (CHUA et al., 2007; MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009; WILLIAMS; MORETON, 1980).

Figura 2 – Estrutura molecular da transferrina diférrica. Adaptada de EL HAGE CHAHINE; HÉMADI; HÁ-DUONG. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1820, n.3, p.334-347, 2012.

Em azul – sítio de ligação amino-terminal; Em vermelho – sítio de ligação carboxi-terminal; Círculo verde – átomo de ferro.

Para a internalização do ferro, a transferrina monoférrica ou diférrica liga-se ao receptor de transferrina (TfR, do inglês Transferrin Receptor), uma proteína celular transmembrana de 190 kDa, expressa em todas as células que requerem ferro. O TfR é composto por dois monômeros dissulfeto de 95 kDa, cada um contendo 760 aminoácidos, organizados dentro de 3 porções: um extenso domínio extracelular C-terminal de 671 aminoácidos, um domínio transmembrana de 28 aminoácidos e um domínio citoplasmático N-terminal de 61 aminoácidos (SPEECKAERT, M; SPEECKAERT, R.; DELANGHE, 2011).

O domínio extracelular do TfR1 é arranjado em três subdomínios: helicoidal, apical e protease-like, que forma uma pseudocavidade de aproximadamente 10Å com a membrana plasmática (Figura 3). A porção C-terminal da transferrina diférrica e da transferrina monoférrica Tf-Fe interage com o subdomínio helicoidal do receptor, enquanto a porção N-terminal da transferrina diférrica ou transferrina monoférrica Fe-Tf interage com o subdomínio protease-like, na cavidade com a membrana plasmática. A interação da porção C-terminal de Fe₂-Tf ao subdomínio helicoidal do receptor é forte e rápida (cerca de 50 microssegundos), enquanto a interação da porção N-terminal na cavidade formada entre o subdomínio protease-like e a membrana plasmática é fraca e muito lenta (2 a 6 horas) (EL HAGE CHAHINE; HÉMADI; HÁ-DUONG, 2012).

Domínio extracelular do TfR1

Figura 3 – Estrutura molecular do domínio extracelular do receptor de transferrina 1. Adaptada de EL HAGE CHAHINE; HÉMADI; HÁ-DUONG. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1820, n.3, p.334-347, 2012.

Em verde – subdomínio helicoidal; Em laranja – subdomínio apical; Em azul – subdomínio protease-like; TfR1 – receptor de transferrina 1.

Os precursores dos eritrócitos expressam altos níveis de TfR1. A Tf se liga ao ferro na forma férrica com alta afinidade, em pH 7,2, formando o complexo Tf-Fe³⁺, que se liga ao receptor e este novo complexo TfR1-Tf-Fe³⁺ é internalizado por endocitose. A vesícula internalizada (endossomo) é acidificada (pH 5,5) pela ação da H⁺ATPase e a medida que o pH diminui, a estrutura do complexo TfR1-Tf-Fe³⁺ se altera e o ferro é liberado. O Fe³⁺ é reduzido a Fe²⁺ por Steap3 (do inglês, Six transmembrane epithelial antigen of prostate-3) e, subsequentemente, exportado para o citosol pela DMT-1, o qual será usado na produção do heme, nas células eritroides, ou armazenado na forma de ferritina, nas células não eritroides. O heme, sintetizado na mitocôndria e exportado para o citosol, é incorporado às novas cadeias de globina sintetizadas, formando a hemoglobina. O complexo Tf-TfR1 é exocitado por endossomo de reciclagem, o TfR1 volta a superfície celular e libera a Tf no plasma (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008; IOLASCON; DE FALCO; BEAUMONT, 2009) (Figura 4).

Figura 4 – Ciclo do receptor de transferrina. Adaptada de DE DOMENICO et al. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.9, n.1, p.72-81, 2008. Tf – transferrina; Fe – ferro; TfR – receptor de transferrina; STEAP3 – do inglês, six transmembrane epithelial antigen of the prostate 3; DMT1 – proteína transportadora de metal divalente 1.

TfR2 é expresso principalmente em hepatócitos e se liga ao complexo Tf-Fe³⁺ com menor afinidade que o TfR1 (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

O receptor de transferrina solúvel (sTfR, do inglês soluble Transferrin Receptor) é uma proteína de 85 kDa, com uma única cadeia de polipeptídeos derivada da clivagem proteolítica do receptor de transferrina, na matriz metaloproteinase, entre arginina-100 e leucina-101, no domínio extracelular. O sTfR pode ser mensurado no soro humano e sua concentração reflete a concentração do receptor na superfície das células. O número de células expressando esse receptor está relacionado à demanda celular de ferro e a taxa de proliferação eritroide (SKIKNE, 2008; SPEECKAERT, M; SPEECKAERT, R.; DELANGHE, 2011). A concentração de sTfR está aumentada em pacientes com expansão eritropoética, incluindo anemias hemolíticas, síndromes mielodisplásicas, pacientes que recebem agentes estimuladores da eritropoese (SPEECKAERT, M; SPEECKAERT, R.; DELANGHE, 2011) e talassemias. Demir et al. (2004) demonstraram aumento na concentração de sTfR nos casos de traço β -talassêmico.

Os eritrócitos humanos possuem uma sobrevida média de 120 dias. Devido ao esgotamento metabólico, os eritrócitos senescentes são fagocitados pelos macrófagos. Nos lisossomos, o heme é catabolizado pela enzima hemeoxigenase liberando o ferro que pode ser exportado pela Fpn ou ser estocado na forma de ferritina (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

O ferro estocado no citosol como ferritina e, após quebra da ferritina pelos lisossomos, como hemossiderina, representa 80% do estoque, o restante está associado às proteínas e em pools de ferro em trânsito. A hemossiderina representa uma pequena fração dos estoques normais de ferro, principalmente nos macrófagos, mas pode aumentar drasticamente na sobrecarga de ferro. Os macrófagos também podem obter ferro pela fagocitose de bactérias e de células que sofreram apoptose (CHUA et al., 2007; MUÑOZ; VILLAR; GARCÍA-ERCE, 2009).

A ferritina é uma proteína multimérica consistindo de 24 subunidades de dois tipos H (do inglês, heavy) e L (do inglês, light) codificadas por genes localizados nos cromossomos 11 e 19, respectivamente. A razão das subunidades H e L varia de acordo com o *status* fisiológico da célula, tipo de tecido e estágio do desenvolvimento. Cada molécula de ferritina é capaz de estocar aproximadamente 4500 átomos de ferro férrico (Fe⁺³) de forma segura prevenindo que o ferro não participe de danos oxidativos (LATUNDE-DADA, 2009; WANG et al., 2010).

A ferritina sérica possui relativamente pouco ferro. Acredita-se que a ferritina sérica seja glicosilada e composta primariamente de subunidade L. A origem e o mecanismo secretor da ferritina sérica não está completamente esclarecido, entretanto é sabido que hepatócitos, macrófagos e células de Küpffer secretam ferritina (WANG et al., 2010). Inúmeros pesquisadores demonstraram que a concentração de ferritina sérica reflete o estoque de ferro (COOK et al. 1974; LIPSCHITZ; COOK; FINCH, 1974; WALTERS; MILLER; WORWOOD, 1973).

As situações mais importantes que promovem a mobilização de ferro no organismo são: sobrecarga de ferro, inflamação e infecção que aumentam a síntese de hepcidina e, deficiência de ferro, eritropoese acelerada e hipóxia que diminuem a síntese de hepcidina (ANDREWS, 2005; NEMETH; GANZ, 2006). Esses estímulos são coordenados pelo hormônio hepcidina e se associam com o aumento ou diminuição da absorção intestinal e, retenção ou liberação de ferro pelo mecanismo de reciclagem dos macrófagos.

1.2 – Hepcidina: síntese e catabolismo

A hepcidina (Hep) foi descoberta em 2000 como um peptídeo antimicrobiano expresso no fígado, denominada inicialmente como LEAP-1 (do inglês, liver-expressed antimicrobial peptide) (KRAUSE et al., 2000). Em 2001 foi denominada como hepcidina devido a origem hepática e essa nomenclatura foi melhor aceita pela comunidade científica (PARK et al., 2001). Somente em 2003, Tomas Ganz, ao estudar dois casos de hemocromatose juvenil com defeitos no gene *HAMP*, descobriu o papel da hepcidina como regulador do metabolismo de ferro (GANZ, 2003).

A Hep é sintetizada nos hepatócitos sendo um produto de 2,5 kb do gene *HAMP*. Este gene consiste de 3 *exons* e 2 *introns* localizados no braço longo do cromossomo 19 (NCBI Gene ID 57817). As principais formas bioativas da Hep são peptídeos contendo 25, 22 e 20 aminoácidos. Hep-25 possui as propriedades antimicrobial e reguladora do metabolismo do ferro, a Hep-22 possui apenas atividade antimicrobial *in vitro*, enquanto as da Hep-20 não foram esclarecidas. O hormônio hepcidina, Hep-25, inibe a passagem de ferro para o plasma das suas três fontes de obtenção de ferro: absorção no duodeno pela dieta, reciclagem pelos macrófagos e liberação do estoque nos hepatócitos (GANZ; NEMETH, 2012).

Hep faz parte do sistema imune inato e é fortemente induzida durante infecções e inflamação. Sua síntese é mediada por interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1), mas

outros mediadores como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-10 (IL-10) participam da homeostase do ferro (MALYSZKO; MYSLIWICC, 2007; WEISS, 2002).

TNF- α e IL-1 estimulam a síntese de ferritina; IL-6 inibe a expressão de RNAm do TfR e estimula a captação de Fe²⁺ pela via DMT-1; IL-10 estimula a via IRE/IRP (do inglês, iron-responsive elements/iron regulatory proteins); IFN- γ inibe a expressão de RNAm do TfR, induz a retenção de ferro pela hiporregulação da expressão de Fpn, estimula a expressão de DMT-1 e a captação de Fe²⁺. O aumento na produção de Hep reduz a transferência de ferro dos enterócitos para o plasma e inibe a mobilização do ferro estocado nos macrófagos. Como consequência, o estoque de ferro é elevado e a eritropoese é deficiente de ferro (MALYSZKO; MYSLIWICC, 2007; WEISS, 2002).

Pequena quantidade de Hep é sintetizada em outras células e tecidos, incluindo macrófagos, adipócitos e cérebro, o que é importante tanto porque a Hep circulante pode não atravessar a barreira hematoencefálica como pela possibilidade de controle autócrino e parácrino de fluxo de ferro (NEMETH; GANZ, 2009). A Hep circula no sangue ligada com alta afinidade (Kd 177 $\pm$ 27 nM) à proteína plasmática α -2-macroglobulina (PESLOVA et al., 2009).

Quando uma molécula de Hep se liga a cada monômero da Fpn, na porção extramembrânica, promove a ligação e ativação da *Janus Kinase2* (Jak2) ao monômero da Fpn no citosol. Jak2 por sua vez fosforila a Fpn permitindo a internalização do complexo Hep-Fpn e sua degradação, bloqueando a liberação de ferro das células. Como consequência, ocorre acúmulo de ferro nessas células e redução da passagem de ferro para o plasma, o que resulta na baixa saturação da transferrina (%Tsat) e menos ferro é liberado para o desenvolvimento dos eritroblastos (DE DOMENICO et al., 2009).

A Hep inibe a transcrição da DMT-1 o que leva à inibição da captação de ferro pelos enterócitos, enquanto os níveis de Fpn e seu RNAm nessas células não se alteram (DE DOMENICO et al., 2009; NEMETH, 2008).

A expressão de Hep pode ser regulada de duas formas (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008) (Figura 5):

a) a transcrição do gene HAMP (do inglês, Hepcidin Antimicrobial Peptide) que codifica Hep depende da sinalização dos receptores das proteínas BMPs (do inglês, Bone Morphogenetic Proteins) e fatores de transcrição SMAD, classe de proteínas que modulam a atividade de fatores de crescimento β -ligantes. A ativação dos receptores (BMPRs) na superfície da célula pelos BMPs leva a geração do receptor de fosforilação (R-SMADs), formando dímeros com

SMAD4. A ligação de hemojuvelina (Hjv) à membrana como correceptor das BMPs aumenta a eficiência do gene de transcrição HAMP. Hemojuvelina solúvel (sHjv) pode se ligar à BMP e bloquear a ativação das BMPs assim como a expressão de Hep. Citocinas inflamatórias como a IL-6 se ligam aos receptores de IL-6, ativando o STAT3 (do inglês, Signal Transducer and Activator of Transcription-3), que então se liga ao promotor do gene HAMP e induz a expressão de Hep. A ativação de STAT3 requer a presença de SMAD4. O receptor de transferrina-2 (TfR2) e HFE funcionam em conjunto com o SMAD4 e ativam o promotor do gene HAMP, possivelmente por um sinal independente ou por afetar o sinal de transdução do BMPR.

b) em condições de hipóxia, o fator de indução de hipóxia (HIF, do inglês hypoxia inducible fator) se liga ao gene promotor HAMP e bloqueia a expressão de Hep. Eritropoese defeituosa resulta no aumento dos níveis do fator de diferenciação do crescimento-15 (GDF15) que se liga à família de receptores TGF β , receptor do fator de diferenciação do crescimento-15 (GDF15R), e induz uma sinalização de bloqueio ao gene de transcrição HAMP.

Figura 5 – Regulação da expressão gênica de hepcidina. Adaptado de NEMETH. Iron regulation and erythropoiesis. **Curr. Opin. Hematol.**, v.15, n.3, p.169-175, 2008.

[] Fe-Tf – concentração de ferro ligado a transferrina; TfR1 – receptor de transferrina 1; TfR2 – receptor de transferrina 2; HFE – proteína de hemocromatose; Hjv – hemojuvelina, sHjv – hemojuvelina solúvel; BMPs – proteínas morfogenética óssea; BMPR – receptor das proteínas morfogenética óssea; Smad4 – membro 4 da família Smad; R-Smad – receptor de fosforilação da família Smad; TFs – fatores de transcrição; hep – hepcidina.

A eritropoetina (Epo) é uma glicoproteína de 30,4 kDa cuja produção, nos rins, primariamente é controlada pela tensão de oxigênio. Esse mecanismo envolve o HIF, fator de transcrição que se liga ao elemento responsivo de hipóxia presente na região flanqueadora 3' do gene EPO. Epo é o principal regulador da eritropoese tanto em condições basais como em condições de estresse. Epo liga-se ao seu receptor específico (EpoR), expresso na membrana de precursores eritroides. Se as condições requeridas para as sínteses de hemoglobina e DNA são adequadas, o sinal que é transmitido ao núcleo previne apoptose e permite que a célula complete sua maturação. Epo, assim como o HIF, é capaz de diminuir a produção de hepcidina nos hepatócitos, *in vitro* (FIBACH; RACHMILEWITZ, 2014; FRIED, 2009).

O fator de diferenciação do crescimento 15 (GDF15, do inglês Growth Differentiation Factor), um membro da superfamília TGF- β , foi identificado como supressor da produção de hepcidina e é expresso em altos níveis em pacientes com eritropoese ineficaz ou apoptótica.

Alguns pesquisadores apontam a BMP-6 como chave na regulação endógena da expressão de hepcidina e do metabolismo de ferro (ANDRIOPOULOS et al, 2009; CORRADINI et al., 2011).

A maior parte da excreção de Hep é feita pelos rins. Em condições fisiológicas, a concentração de Hep na urina correlaciona-se bem com os níveis de Hep circulante. Segundo Ganz et al. (2008), a concentração urinária da Hep é mais baixa nas mulheres do que nos homens, com média de 394 e 861ng de Hep/mg de creatinina, respectivamente. Com base na concentração de Hep no soro e na urina parece que somente 5% da Hep do plasma, filtrada nos rins, é excretada intacta na urina.

1.1 - Desordens na síntese de Hemoglobina

Dentre os distúrbios da síntese da hemoglobina estão: a deficiência de ferro (DF), que resulta de um longo período do balanço negativo do micronutriente podendo evoluir para anemia por deficiência de ferro (ADF) e as hemoglobinopatias - hemoglobinas variantes e talassemias - que resultam de alterações moleculares simples ou complexas, como mutações e deleções.

1.3.1 Deficiência de ferro

Os três estágios da depleção de ferro, que correspondem ao balanço negativo do ferro, são depleção dos estoques, eritropoese deficiente de ferro e ADF, que resulta na baixa

concentração de hemoglobina com eritrócitos microcíticos e hipocrômicos (IOLASCON; DE FALCO; BEAUMONT, 2009).

O segundo estágio referido como eritropoese deficiente de ferro caracteriza-se por alterações bioquímicas como ferro sérico e saturação da transferrina diminuídos e sTfR aumentado, que refletem insuficiência de ferro para produção normal de Hb e outros compostos férricos, ainda que a concentração de Hb não esteja reduzida (PAIVA; RONDO; GUERRA-SHINOHARA, 2000). A DF afeta a saúde de mais de 1,5 bilhões de pessoas, mais seriamente as mulheres no estado reprodutivo e crianças jovens em países menos desenvolvidos (KORDAS, 2010; TOLENTINO; FRIEDMAN, 2007).

O terceiro e último estágio, ADF, caracteriza-se pela diminuição dos níveis de Hb, com prejuízos funcionais ao organismo, tanto mais graves quanto maior for essa redução (PAIVA; RONDO; GUERRA-SHINOHARA, 2000). ADF é uma das desordens mais comum no mundo. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), 30% da população possui anemia por deficiência de ferro e é especialmente prevalente em países em desenvolvimento (CHUA et al., 2007; GASCHÉ et al., 2004).

A ADF tem significativo impacto na qualidade de vida dos pacientes afetados resultando em uma grande variedade de efeitos adversos incluindo atraso no desenvolvimento psicomotor e cognitivo em crianças, intolerância ao exercício físico, diminuição da produtividade no trabalho e em outras atividades do dia-a-dia (KORDAS, 2010; TOLENTINO; FRIEDMAN, 2007), termorregulação defeituosa, disfunção do sistema imune e endócrino, distúrbios do trato gastrointestinal aumentando o risco de absorção de metais pesados (WHO, 2001). ADF pode ser revertida por dieta adequada (JIMENEZ et al., 2010) e reposição oral de ferro e/ou alimentos fortificados em programas de suplementação.

1.3.2. Hemoglobinopatias

A hemoglobina (Hb), uma proteína de peso molecular de 64450 daltons, é composta de duas cadeias globínicas do tipo alfa e duas do tipo beta com uma molécula heme (ferroprotoporfirina IX) ligada em cada globina. Sua principal função nos mamíferos é o transporte de oxigênio (O₂) dos pulmões aos tecidos, entretanto, a Hb também transporta dióxido de carbono (CO₂), monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO), que tem papel biológico importante. A reversibilidade da ligação do ferro ferroso no grupo heme de cada globina permite à Hb o transporte de O₂, CO e NO. Já o CO₂, que não se liga ao ferro, é

transportado por uma interação amino-terminal formando com a Hb um complexo carbamino fraco (HILL et al., 1962; SCHECHTER, 2008).

Cada subunidade globina deve formar uma ligação estável com heme, situado na superfície externa da proteína, para que o O_2 presente no citosol dos eritrócitos possa se ligar reversivelmente ao átomo de ferro do heme. A fenda hidrofóbica na qual o heme está inserido deve proteger o Fe^{2+} de se oxidar a Fe^{3+} , que é incapaz de se ligar ao O_2 .

O tetrâmero Hb possui duas estruturas quaternárias: a T ou deoxi, conformação com baixa afinidade ao O_2 , e a R ou oxi, conformação com alta afinidade ao O_2 . A transição da conformação oxi para a deoxi ocorre com o deslocamento relativo dos átomos de ferro no plano heme e a abertura da cavidade central entre as β -globinas (Figura 6) para permitir a ligação do 2,3-difosfoglicerato (2,3-DPG), pequena molécula efetora com capacidade de enfraquecer a ligação Hb- O_2 . A pressão de O_2 atmosférico influencia a liberação de O_2 nos tecidos; em situações de hipóxia essa transferência se torna mais lenta, em compensação o organismo produz maior quantidade de 2,3-DPG. O comportamento alostérico da Hb é acionado por duas moléculas de 2,3-DPG, liberando o O_2 nos tecidos com baixa tensão do mesmo, enquanto que nos tecidos com alta tensão de O_2 , como os pulmões, as moléculas de 2,3-DGP são deslocadas do centro da hemoglobina desoxigenada para facilitar a captação de oxigênio (BREWER, 1974; FORGET; BUNN, 2013; SCHECHTER, 2008).

Figura 6 – Estruturas quaternárias da hemoglobina. Adaptado de SCHECHTER et al. ASH 50th anniversary review Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, v. 112, n. 10, p. 3927–3938, 2008. α – α -globina; β – β -globina.

Existem *loci* genéticos distintos para cada cadeia polipeptídica da molécula de hemoglobina, assim há os genes alfa (α), beta (β), gama (γ), delta (δ), épsilon (ϵ) e zeta (ζ). O *cluster* α está localizado no braço curto do cromossomo 16 e contém o promotor HS-40 (do inglês, Hypersensitivity Site-40) que promove a transcrição do RNA das globinas α e ζ , sendo ζ sintetizada no saco vitelínico e α nos nichos hematopoéticos do fígado, baço e medula óssea durante o desenvolvimento. O *cluster* β está localizado no cromossomo 11 e contém um grupo de pelo menos cinco regiões no DNA que controlam a transcrição do RNA das globinas β , δ , γ e ϵ denominado LCR (do inglês, Locus Control Region) que é hipersensível a clivagem pela nuclease DNase I. A síntese inicia-se no saco vitelínico com a produção da globina ϵ ; com a transição do nicho hematopoético para o fígado, baço e medula óssea são produzidas as globinas γ , δ e β , sendo prevalente a síntese da globina γ antes do nascimento e da globina β após o nascimento. Assim, durante o estágio embrionário ocorre síntese das Hb Gower 1 ($\zeta_2\epsilon_2$), Hb Portland ($\zeta_2\gamma_2$), e Hb Gower 2 ($\alpha_2\epsilon_2$); no período fetal a síntese da Hb F ($\alpha_2\gamma_2$) e na fase adulta das Hb A ($\alpha_2\beta_2$) e Hb A₂ ($\alpha_2\delta_2$) (Figura 7). Após seis meses de vida, a hemoglobina consiste de aproximadamente 95% de Hb A, menos de 3,2% de Hb A₂ e uma quantidade inferior a 1% de Hb F (CUNNINGHAM, 2010; SCHECHTER, 2008; WEATHERALL, 2001).

Figura 7 – Genes da hemoglobina humana nos cromossomos 16 e 11. Adaptada de WEATHERALL. *Thalassemias*. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd., p. 1-5, 2005.

Próximos às regiões promotoras dos genes das globinas, há fatores de transcrição que regulam o início e taxa de transcrição do RNA mensageiro (RNAm), ativação ou silenciamento de cada gene da globina como GATA-1 e EKLF. Recentemente, uma variedade de outros fatores de transcrição ou complexos de controle individual dos genes da globina e do sequenciamento vem sendo estudados; entre eles podemos citar: NF-E2, BP-1, SSP, FOG, FKLF, DRED e PYR (SCHECHTER, 2008).

Os genes de globinas podem sofrer alterações moleculares simples ou complexas. As consequências funcionais dependem do local e tipo da lesão molecular, podendo provocar supressão da síntese da cadeia de globina, redução no ritmo de síntese ou produção de cadeias com alterações estruturais variadas (ZAGO, 2004a).

A hemoglobina S (Hb S) e a hemoglobina C (Hb C) são exemplos de alterações estruturais da cadeia globínica. A Hemoglobina S (Hb S) é resultado de uma mutação pontual (GAG $\rightarrow$ GTG) no códon do gene da β -globina, o que leva à substituição de ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia β . A hemoglobina C é o resultado de uma mutação pontual (GAG $\rightarrow$ AAG) no códon do gene da β -globina, que leva à substituição de ácido glutâmico por lisina na sexta posição da cadeia polipeptídica β (BONINI-DOMINGOS, 2006).

Diferentes tipos de talassemias são encontrados na população, sendo as mais comuns a α - e β -talassemia.

A α -talassemia é provavelmente a doença monogenética mais comum no mundo. É causada por deleções ou mutações de um ou de ambos os genes da α -globina ($\alpha 2$ e $\alpha 1$) curto de cada cromossomo 16 (16p13.3) que resulta em diminuição da produção da cadeia da α -globina, pois a ausência completa é incompatível com a vida. É especialmente frequente nos países do Mediterrâneo, sudeste da Ásia, África, Oriente Médio e Índia. Nas últimas décadas, a incidência de α -talassemia tem aumentado devido às migrações (HARTEVELD; HIGGS, 2010; KAN, 1985; VICHINSKY, 2010). Pelo menos 20% da população mundial é portadora de alguma forma de α -talassemia (MODELL; DARLISON, 2008).

As β -talassemias são caracterizadas por anomalias na síntese da β -globina resultando em fenótipos que variam de severa anemia a indivíduos clinicamente assintomáticos. A incidência anual de indivíduos sintomáticos é estimada em 1 a cada 100.000 nascimentos no mundo e 1 a cada 10.000 nascimentos na União Europeia (GALANELLO; ORIGA, 2010). É frequente nos países da África, do Mediterrâneo, Oriente Médio, Índia e sudeste da Ásia. (WEATHERALL, 2001).

Os brasileiros descendem principalmente de colonizadores, nativos ameríndios e imigrantes pós-colonização, com destaque aos escravos africanos. Os imigrantes que chegaram ao Brasil, entre os séculos XVI e XIX, são provenientes principalmente de Portugal, Itália, Alemanha e Espanha e um número significativo de imigrantes do Japão, Líbano e Síria (IBGE, 2000; SALZANO; BORTOLINI, 2002). Callegari-Jacques et al. (2003) demonstraram em um estudo de proporção acumulada de ancestrais que a região sudeste do Brasil possui $75 \pm 0,2\%$, $18 \pm 0,1\%$ e $7 \pm 0,1\%$ de ancestrais europeus, africanos e nativos ameríndios, respectivamente.

Estudo realizado para estabelecer a frequência das hemoglobinopatias e talassemias em pacientes com anemia não ferropênica demonstrou que 63,8% eram portadores de alguma forma de anemia hereditária: 25,9% de α -talassemia heterozigota, 32,8% de β -talassemia heterozigota, 3,4% de heterozigose para hemoglobina S (Hb AS) e 1,7% de homozigose para hemoglobina C (Hb CC) (WAGNER et al., 2005). Orlando et al. (2000) demonstraram que 24% dos recém-nascidos analisados apresentaram alterações nas hemoglobinas. O rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias realizado por Melo et al. (2008) demonstraram que 13,12% apresentaram alterações de hemoglobina, sendo 1,84% com presença de Hb S; 0,6% com presença de Hb C; 0,65% com resultados sugestivos de β -talassemia e 9,48% sugestivos de α -talassemia. Estes achados demonstram que as hemoglobinopatias são frequentes na população brasileira.

Na região sudeste foi reportado frequência de 1,3% de traço β -talassêmico (RAMALHO et al, 1999) enquanto a de α^+ -talassemia heterozigota devido deleção $-\alpha^{3,7}$ varia entre 20 a 25% na população negra (SONATI et al., 1991) e entre 9 a 12% na população geral (MELO et al., 2008; TAVARES et al., 2011; ZAMARO; HIDALGO; BONINI-DOMINGOS, 2003), sendo o genótipo $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ nessa região proveniente principalmente de descendentes italianos e africanos (WENNING et al., 2000). Estudos recentes demonstraram que a deleção $-\alpha^{3,7}$ é a mais frequente no Brasil (ADORNO et al., 2005; ALCOFORADO et al., 2012; MELO et al., 2008; MELO-REIS et al., 2006; SOUZA et al., 2009; WAGNER et al., 2005; ZAMARO; HIDALGO; BONINI-DOMINGOS, 2003).

1.3.2.1 α -talassemias

As α -talassemias são frequentemente causadas por deleções envolvendo um ou mais genes da α -globina. São subclassificadas de acordo com o número de genes da α -globina afetados em: α^+ -talassemia heterozigota (um gene deletado); α^0 -talassemia (dois genes deletados no mesmo cromossomo ou em *cis*); α^+ -talassemia homozigota, porém com fenótipo

de α^0 -talassemia (dois genes deletados em cromossomos diferentes ou em *trans*); doença da Hb H (três genes deletados); hidropsia fetal com Hb de Bart (quatro genes deletados, incompatível com a vida). Formas não delecionais de α -talassemia são relativamente incomuns como, por exemplo, a Hb Constant Spring (FORGET; BUNN, 2013).

O gene haplótipo da α -globina pode ser escrito $\alpha\alpha$, referindo-se a α_2 e α_1 respectivamente. Um indivíduo normal possui o genótipo $\alpha\alpha/\alpha\alpha$. As deleções envolvendo um ($-\alpha$) ou ambos ($--$) genes são classificadas com base no tamanho como, por exemplo, $\alpha^{-3,7}$ indicando uma deleção de 3,7 quilobases (kb) ou com base na origem geográfica ou familiar como $--^{MED}$ (mediterrâneo), $--^{THAI}$ (Tailândia), $--^{SEA}$ (Sudeste da Ásia). As formas distintas de lesões moleculares que podem causar α^0 -talassemias são deleções desde 5,2 Kb até 30 Kb, incluindo a perda total ou parcial de ambos os genes. As α^+ -talassemias podem resultar de deleções de DNA de 3,7 Kb ou 4,2 Kb e por mutações pontuais ou perdas de pequenos números de bases (ZAGO, 2004b; WEATHERALL, 2006; SCHECHTER, 2008).

Os genes da α -globina estão inseridos dentro de duas unidades de duplicação homólogas de 4 kb. Uma deleção muito comum é a deleção à direita (do inglês, *rightward*) de 3,7 kb, causada pelo pareamento errado dos segmentos Z durante recombinação na meiose, produzindo um cromossomo com somente um α -gene ($\alpha^{-3,7}$) que causa a α^+ -talassemia e outro cromossomo com três α -genes ($\alpha\alpha\alpha^{anti\ 3,7}$) sem efeito talassêmico. Da mesma forma, um pareamento errado dos segmentos X à esquerda (do inglês, *leftward*) resulta numa deleção de 4,2 kb dando origem aos cromossomos $\alpha\alpha\alpha^{anti\ 4,2}$ sem efeito talassêmico e $\alpha^{-4,2}$, que causa α^+ -talassemia (Figura 8) (HARTEVELD; HIGGS, 2010; HIGGS, 2013).

A deleção de dois genes da α -globina, tanto em *cis* ou em *trans*, causam doenças com o mesmo fenótipo, a saber: hipocromia moderada e anemia microcítica com ou sem hemólise. A deleção de três genes é associada com a Doença de Hb H, anemia hemolítica e transfusão de eritrócitos esporádica ou ausente. A hemólise ocorre devido excesso de subunidades de β -globina associadas formando a Hb H. As consequências do excesso de cadeias β e γ nas α -talassemias são muito diferentes. Em primeiro lugar, as cadeias β e γ são mais solúveis e formam tetrâmeros β_4 (hemoglobina H) e γ^4 (hemoglobina Bart) que podem ser detectados por eletroforese. Essas hemoglobinas solúveis não participam da oxigenação dos tecidos, são instáveis e precipitam nos eritrócitos, encurtando sua sobrevida. Há também as α -talassemias não delecionais que usualmente possuem fenótipo mais grave, por causar mutação principalmente no gene α_2 , que produz de 2 a 3 vezes mais RNAm e síntese da α -globina do que o gene α_1 (GALANELLO, 2012; SCHECHTER, 2008).

As cadeias de globina precipitadas interagem com proteínas do citoesqueleto da membrana eritrocitária, alterando suas propriedades e provocando alterações mecânicas. Esses desequilíbrios contribuem para a produção de radicais livres, peroxidação de lipídios e oxidação de proteínas. Essas alterações são consequentes de excesso de ferro e dos excessos de cadeias α , na β -talassemia, ou de cadeias β , na α -talassemia (ZAGO, 2004b).

Figura 8 – Deleções que causam α^+ -talassemia. Adaptada de Harteveld; Higgs. Alpha-thalassaemia. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 5, n. 5, p. 13, 2010.

Rightward crossover – do inglês, recombinação à direita; leftward crossover – do inglês, recombinação à esquerda; as unidades homólogas de duplicação X, Y e Z estão inseridas dentro das caixas coloridas.

1.3.2.2 β -talassemias

Ao contrário das α -talassemias que são causadas principalmente por deleções, os genes da β -globina sofrem predominantemente mutações estruturais.

As β -talassemias possuem um número variado de alterações moleculares como mutações que podem afetar a transcrição, processamento ou tradução do RNAm da β -globina e algumas deleções. Os defeitos moleculares responsáveis pela lesão genética são muito numerosos e podem determinar a ausência completa da síntese de cadeias β , quando envolvem ambos os genes sendo denominada β^0 -talassemia, ou apenas a sua supressão

parcial, quando envolve um gene e é denominada β^+ -talassemia. Apoptose acelerada, causada pelo excesso de deposição de cadeia α em precursores eritroides, é a maior causa de eritropoese ineficaz (RUND; RACHMILEWITZ, 2005; WEATHERALL, 2006).

Raras deleções podem ocasionar β -talassemias, uma dessas deleções, por exemplo, ocorre devido a um *crossing over* desigual entre os genes das globinas δ e β resultando na fusão $\delta\beta$ -globina, denominada gene Lepore, com baixo nível de expressão. Outras deleções em grande parte do cluster β são responsáveis pelas $\delta\beta$ -talassemias, $\gamma\delta\beta$ -talassemias, $\epsilon\gamma\delta\beta$ -talassemias e síndrome hereditária de persistência de Hb F (FORGET; BUNN, 2013).

Persistência de Hb F em heterozigose é uma situação clinicamente importante, pois concentração de Hb F elevada reduz a severidade da anemia falciforme e β -talassemia (MICHELSON, 2008). Iniciativas de elevação farmacológica da Hb F têm demonstrado eficácia terapêutica (HALEY et al., 2003).

Apesar da heterogeneidade molecular das β -talassemias, o fenótipo clínico é relativamente homogêneo devido à patofisiologia comum, a saber: deficiência de tetrâmeros de Hb A e excesso de subunidades α pela incapacidade de formação de tetrâmetros com as subunidades β deficientes. As cadeias α excedentes precipitam e formam agregados nos eritroblastos provocando lesões na membrana, interferem mecanicamente com a célula, comprometendo o ciclo mitótico e o metabolismo celular, provocando sua morte. Em consequência, a maior parte dos eritroblastos é destruída na medula óssea antes de completar o desenvolvimento, fenômeno denominado eritropoese ineficaz, discrepância entre a hiperplasia eritroide da medula óssea e a baixa produção de eritrócitos (FORGET; BUNN, 2013; ZAGO, 2004b).

A AHSP (do inglês, Alpha-Hemoglobin Stabilising Protein), proteína que se liga especificamente às cadeias α -globinas livres, é uma chaperona molecular que permite o dobramento das cadeias α . Alteração na concentração ou função dessa proteína tem sido associada com a variabilidade clínica das β -talassemias, quanto menor os níveis de AHSP mais graves são os sintomas clínicos. A transcrição do RNAm do gene da AHSP é induzida pelo fator de transcrição GATA-1 (LAI et al., 2006).

De acordo com o tipo de mutações no gene da β -globina, associadas ou não a outras modificações genéticas, os pacientes podem requerer transfusões de eritrócitos periódicas e intermitentes (β -talassemia intermediária) ou crônicas (β -talassemia maior) (RIVELLA; GIARDINA, 2012).

Embora a genética das talassemias seja bem conhecida, a compreensão da sua patofisiologia ainda apresenta lacunas. Na última década, com a descrição do papel da

hepdicina no metabolismo do ferro, surgiu uma nova linha de investigação para as patologias que envolvem distúrbios do seu metabolismo. Assim, este trabalho objetiva contribuir com os estudos sobre a participação do metabolismo do ferro na patogênese das talassemias.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o metabolismo do ferro e sua contribuição na patogenia das talassemias

2.2 Específicos

- Avaliar os grupos de estudo α^+ -talassemia heterozigota (TAT), β^+ -talassemia (TBT), β^0 -talassemia (BTM) e comparar com os grupos Controle e Doadores de sangue regulares (DSR).
- Realizar avaliação hematológica e do *status* férrico;
- Determinar níveis séricos de hepcidina;
- Determinar níveis séricos de eritropoetina e o fator de diferenciação do crescimento 15;
- Correlacionar todos os parâmetros analisados, na tentativa de colaborar com a compreensão da fisiopatologia das talassemias.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

A equipe responsável pelo desenvolvimento desta pesquisa foi composta por: Prof^a Dr^a Ana Maria de Souza (orientadora), doutoranda Jacqueline da Silva Guimarães e mestranda Juçara Gastaldi Cominal, todas do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP); Dr. Stefano Rivella do laboratório The Strauss Thalassemia, Departamento Pediatric Hematology Oncology, Weill Medical College da Cornell University de Nova Iorque (WMC-CU), Estados Unidos da América (EUA), onde a doutoranda realizou o doutorado sanduíche; Dr^a Ana Cristina Silva Pinto, médica hematologista do Departamento de Medicina Interna do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC/FMRP-USP), responsável pelos sujeitos da pesquisa; médica hematologista Dr^a Yelena Ginzburg e a estatística Dr^a Vijay Nandi, ambas do Hemocentro de Nova Iorque, EUA; Dr Mark Westerman e Dr^a Gordana Olbina, ambos da Intrinsic LifeSciences de La Jolla, EUA.

3.1 Ética em Pesquisa

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP (Anexo A), na 99^a sessão do dia 17/02/2012 (Protocolo CEP/FCFRP nº 241) e recebeu concordância do CEP/HC-FMRP-USP, em 08/03/2012 (Anexo B). Os participantes da pesquisa se integraram ao projeto após consentimento prévio livre e esclarecido (Anexo C).

3.2 Casuística

Participaram do projeto 226 indivíduos adultos (com mais de 18 anos de idade), de ambos os gêneros da cidade de Ribeirão Preto e região. Indivíduos aparentemente saudáveis (n=177), grupo composto por doadores regulares e pela primeira vez, indivíduos com suspeita de β^+ talassemia (devido a parentesco com portadores de β^0 -talassemia) (n=21), e pacientes do Ambulatório de Hemoglobinopatias do HC/FMRP-USP (n=28) foram recrutados pela Dr^a Ana Cristina Silva Pinto e encaminhados a FCFRP-USP.

Os critérios de inclusão no grupo Controle foram: níveis de hemoglobina maiores que 13,0 g/dL para homens e 12,0 g/dL para mulheres (WHO, 2001), hemograma e avaliação do *status* férrico dentro dos parâmetros de normalidade (Apêndice A), níveis de proteína C-reativa inferior a 3 mg/L, e não portadores de desordens clínicas que alteram o metabolismo de ferro, como doenças inflamatórias e infecciosas agudas e crônicas de qualquer etiologia ou

hemoglobinopatias. Somente mulheres não gestantes foram selecionadas para o estudo.

Dentre os indivíduos aparentemente saudáveis (n=177), 27 foram identificados portadores de desordens da síntese de hemoglobina e somente 51 estavam de acordo com os critérios de inclusão para o grupo Controle. Entretanto, devido possibilidade de alteração no metabolismo do ferro devido doações de sangue regulares, foram formados dois grupos de estudo: grupo Controle (n=28) todos doadores de sangue pela primeira vez e grupo Doadores de Sangue Regulares (DSR, n=23). Os indivíduos que compuseram o grupo DSR doaram sangue pelo menos duas vezes ao ano.

Dentre os 27 indivíduos portadores de desordens da síntese de hemoglobina: 15 foram diagnosticados portadores de α^+ -talassemia heterozigota, 7 deficientes de ferro, 4 com anemia por deficiência de ferro e 1 portador do traço falcêmico. Somente os pacientes com talassemia foram objeto de estudo nesta pesquisa.

Os critérios de inclusão nos grupos talassemias foram mulheres não gestantes, não portadores de síndrome metabólica e/ou quadro laboratorial indicativo da presença de infecção, não portadores de $\alpha\beta$ -talassemia e coleta sanguínea anterior à transfusão sanguínea.

Os portadores de talassemias que se adequaram aos critérios de inclusão foram divididos em três grupos de estudo: α^+ -talassemia heterozigota (TAT, n=14), β^+ -talassemia (traço β -talassêmico, TBT, n=20) e β^0 -talassemia (β -talassemia maior, BTM, n=27), não tendo sido incluídos nestes grupos pacientes que apresentavam síndromes metabólicas e/ou quadro laboratorial indicativo da presença de infecção.

Todos os indivíduos que não se adequaram a um dos critérios de inclusão, Controle ou Talassemias, foram excluídos da pesquisa.

3.3 Coleta do Material

Os pacientes com β^0 -talassemia do Ambulatório de Hemoglobinopatias do HC/FMRP-USP são avaliados mensalmente e encaminhados para transfusão sanguínea. Os participantes da pesquisa foram encaminhados a FCFRP-USP, para coleta do material biológico, antes da transfusão sanguínea.

A coleta do material biológico foi realizada pela manhã, com jejum de 8 horas, por profissional com reconhecida prática, o que garantiu uma punção venosa o menos traumática possível. Foram coletados, por punção das veias da fossa cubital, 20 mililitros (mL) de sangue, distribuídos em dois tubos: 2 mL em um contendo etileno diamino tetracetato de potássio (EDTA K2), utilizado na avaliação hematológica, extração de DNA e hemolisado

realizadas no mesmo dia; 18 mL em outro isento de anticoagulante destinado à obtenção de soro.

As alíquotas de DNA e soro foram congeladas a -80°C , sendo uma alíquota de soro fresca utilizada no mesmo dia para a quantificação das frações de transferrinas. Estes procedimentos bem como a determinação dos níveis séricos de receptor solúvel de transferrina foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Hematologia Clínica da FCFRP-USP, sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza. Amostras de soro foram posteriormente encaminhadas ao Serviço de Análises Clínicas da FCFRP-USP para as determinações dos níveis séricos de ferritina e proteína C reativa.

Alíquotas de soro foram também enviadas para Weill Medical College da Cornell University, para que, durante a estadia da doutoranda, fossem realizadas as seguintes determinações: ferro sérico, saturação de transferrina, capacidade total de ligação de ferro (CTLF), receptor solúvel de transferrina, eritropoetina, GDF15 e hepcidina.

3.4 Avaliação hematológica

Foram determinados: número global de eritrócitos e leucócitos, concentração de hemoglobina, valor do hematócrito (Hct), índices hematimétricos (volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM)) e distribuição da amplitude das células vermelhas (RDW), utilizando contador de células Micros 60 (ABX Diagnostics, Montpellier, France); contagem diferencial de leucócitos, estudo da morfologia celular e correção do número de leucócitos nos casos com eritroblastos, por microscopia óptica, em extensão sanguínea corada por Leishman.

3.5 Extração de DNA

Extração de DNA genômico foi realizada utilizando *AxyPrepTM Blood Genomic DNA Miniprep Kit (nucleic acid Purification kit)*, Axygen Biosciences, segundo as instruções do fabricante. Os símbolos dos genes e proteínas utilizados no trabalho foram revisados segundo aprovação do “*HUGO Gene Nomenclature Committee*” (HGNC) (SPLENDORE, 2005).

3.6 Determinações qualitativa e quantitativa das frações de hemoglobina

Para a obtenção da solução de hemoglobina (hemolisado) utilizada nessas determinações, as amostras de sangue total foram submetidas à hemólise.

Nos indivíduos com suspeita de β^+ -talassemia, foi realizada quantificação das hemoglobinas A, A2 e F pelo sistema automatizado Variant II Bio-Rad®, USA, utilizando o kit *β -talassemia Short Program*. Neste método, procede-se a separação e quantificação das hemoglobinas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês High Performance Liquid Chromatography) associada à cromatografia de troca iônica (Figura 9A).

Nas amostras dos indivíduos aparentemente saudáveis e dos pacientes β^0 -talassêmicos realizou-se detecção qualitativa e quantitativa das hemoglobinas por eletroforese de hemoglobina em meio alcalino (pH 8,6). O hemolisado foi aplicado na extremidade da fita de acetato de celulose (polo negativo) fixado na cuba com solução tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6 (0,025M) sendo a corrida realizada a 300 Volts, por 1 hora. Para a quantificação das frações de hemoglobina, as fitas foram coradas com Ponceau S e transparentizadas (NAOUM, 1999). A porcentagem de cada fração foi determinada por densitometria, utilizando o densitômetro de eletroforese DenGO, Qualitem® (Figura 9B).

Figura 9 - Exemplos de eletroforese de hemoglobina. A) Cromatograma obtido pelo equipamento Variant II (Bio-Rad™) de HPLC demonstrando HbF aumentada de um adulto com β^0 -talassemia. B) Cromatograma obtido pelo densitômetro Dengo (Qualitem®) após transparentização da eletroforese alcalina (NAOUM, 1999) demonstrando perfil de um adulto saudável.

3.7 Caracterização dos pacientes com α^+ -talassemia

A pesquisa da deleção $\alpha^{-3,7}$, a mais frequente no Brasil, foi realizada em todos os sujeitos da pesquisa (n=226) por PCR convencional (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*), segundo Dodé et al. (1993), utilizando os oligonucleotídeos C9c (5' CCATGCCTGGCACGTTTGCTGAGG 3') *downstream primer* específico dos genes $\alpha 1$ e $\alpha 2$ e C10 (5' GATGCACCCACTGGACTCCT 3') correspondendo as nucleotídeos 24-44 de ambas as regiões homólogas Y.

Aproximadamente 100 ng de DNA genômico foi amplificado com 2,5 unidades de Taq DNA Polimerase Recombinante (5,0 U/ μ L, InvitrogenTM). O mix da reação (50 μ L) foi composto por 34 μ L de água ultrapura DEPC (livre de DNases, LGC Bio[®]), 5,0 μ L de tampão para PCR $\alpha^{-3,7}$, 5,0 μ L de dimetil sulfoxido (DMSO P.A., Synth[®]), 1,5 μ L de mix homogêneo dos dNTPs (10,0 mM, InvitrogenTM), 1,0 μ L do oligonucleotídeo C9c (1,0 μ g/ μ L, EurofinsTM) e 1,0 μ L do oligonucleotídeo C10 (1,0 μ g/ μ L, EurofinsTM), 0,5 μ L de Taq DNA Polimerase Recombinante (5,0 U/ μ L, InvitrogenTM) e 2,0 μ L de DNA genômico.

O tampão para PCR $\alpha^{-3,7}$ foi preparado previamente utilizando 5,0 mL de água ultrapura DEPC (livre de DNases, LGC Bio[®]), 3,35 mL de solução Tris-HCl 2,0 M (pH 8,8), 1,66 mL de solução $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,0 M, 250 μ L de solução MgCl_2 1,0 M (25 mmol/L), 85 μ L de BSA (20 mg/mL, albumina bovina, Sigma[®]), 70 μ L de β -mercapto etanol 14,3 M (Sigma[®]), 33,5 μ L de solução Na_2EDTA 0,2 M (670mM/L) e completado com água ultrapura q.s.p.: 10 mL. O tampão foi dividido em alíquotas de 1,0 mL e congelado a -20°C .

A amplificação foi realizada no termociclador (Eppendorf[®]) em 30 ciclos sob as seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos no primeiro ciclo e 45 segundos em cada ciclo subsequente; anelamento a 56°C por 1 minuto; extensão a 72°C por 1 minuto nos 29 ciclos e por 10 minutos no último ciclo.

Para identificação, os produtos de DNA obtidos na amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com 2,0 μ L de solução de brometo de etídio (10 mg/mL) para cada 30 mL de gel. A corrida foi realizada utilizando tampão TEB 1X (InvitrogenTM, pH 8,0) por 1h, a 100 volts. Os resultados foram fotografados em foto-revelador ultra-violeta (Figura 10). O fragmento de indivíduo saudável possui 2,1 kb e a deleção $\alpha^{-3,7}$ possui 1,9 kb sendo o marcador ideal o λ DNA/Hind III, da InvitrogenTM.

Figura 10 - Exemplo de Eletroforese de DNA em gel de agarose. Sujeitos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 não possuem a deleção. M indica o marcador λ DNA/Hind III, da InvitrogenTM. Sujeitos 5, 10, 11 são heterozigotos para a deleção α ^{-3,7}.

3.8 Status férrico

3.8.1 Ferro, CTLF e saturação de transferrina

Os níveis séricos de ferro, CTLF e %Tsat foram determinados pelo método colorimétrico utilizando kit Pointe Scientific, Inc., Canton, MI, EUA, segundo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada pelo equipamento da Thermo ScientificTM, MultiSkan GO versão 2.

3.8.2 Ferritina sérica

Os níveis séricos de ferritina foram determinados pelo método Imunoquimio-luminescente, utilizando *Immulite Ferritin kit*, SiemensTM e o equipamento Immulite 1-DPCTM, Inglaterra, segundo as instruções do fabricante.

3.8.3 Receptor de transferrina solúvel

A concentração de sTfR foi determinada por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando o kit *Quantikine soluble transferrin receptor* da R&D SystemsTM, Minneapolis,

EUA, e o aparelho leitor de microplacas de ELISA READER 210, acoplado a lavadora de placas WASHER 200, modelo Microwell System Organon Teknika™, Áustria, na FCFRP-USP, Brasil. Na Weill Medical College, da Cornell University, EUA, foi utilizado o mesmo kit diagnóstico e o leitor de microplacas de ELISA da Thermo Scientific™, Multiskan GO versão 2, após ajuste da concentração utilizando como controle adicional amostras analisadas no Brasil.

3.8.4 Índice sTfR/log ferritina

O índice sTfR/log ferritina foi calculado dividindo os níveis do receptor solúvel de transferrina (mg/L) pelo logaritmo da concentração sérica de ferritina (Suominen et al., 1998).

3.8.5 Frações de Transferrina sérica

As frações de transferrina (Tf, Tf-Fe, Fe-Tf, Fe₂-Tf) foram analisadas no soro fresco, até 1 hora após coleta, por eletroforese em gel de ureia, segundo Williams e Moreton (1980) utilizando gel Novex® TBE-Ureia 6%, da Invitrogen™ e cuba vertical de eletroforese Xcell Surelock™ Mini-Cell, da Invitrogen™ (Figura 11).

Para precipitação da maioria das proteínas séricas foram centrifugados a 1000 g por 5 minutos 400 µL de TBE-Rivanol com 50 µL de soro fresco. A solução TBE-Rivanol foi preparada utilizando 0,375% de Rivanol (6,9-diamino-2-ethoxyacridine lactate, fórmula química do inglês) Sigma-Aldrich® e 10% de glicerol em tampão Tris-Borato-EDTA. O sobrenadante foi removido para um novo tubo e o precipitado descartado.

A eletroforese foi realizada em cuba vertical Xcell Surelock™ Mini-Cell, da Invitrogen™. Foi aplicado no gel Novex® TBE-Ureia 6%, da Invitrogen™ 9 µL do sobrenadante com 9 µL de Novex® TBE-Ureia (1X). Foram utilizados como marcadores 2 µL de Apo-Tf humana 50 µg/µL e Holo-Tf humana 50 µg/µL (Sigma-Aldrich®) com 9 µL de Novex® TBE-Ureia (1X). A corrida foi realizada utilizando tampão TEB 1X (Invitrogen™, pH 8,0) por 3h, a 170 volts. Os géis foram corados com solução de Coomassie Brilliant overnight no agitador automático e descorados com solução aquosa de metanol 45% e ácido acético glacial 10% no agitador automático por 1 hora. Após coloração foram prensados com placas de vidro entre duas folhas de papel celofane umedecidas em água e mantidos a temperatura ambiente até secagem completa do gel. A porcentagem de cada fração foi determinada por densitometria utilizando o densitômetro de eletroforese DenGO, Qualitem®.

Figura 11 - Exemplo de eletroforese de transferrina. O perfil da corrida demonstra respectivamente Ig, Apo-Tf, Tf-Fe, Fe-Tf, x e Fe₂-Tf. 1- marcador Holo-Tf (Sigma-Aldrich®); 2 – marcador Apo-Tf (Sigma-Aldrich®). Sujeitos 3, 5, 6, 8 e 9 β^0 -talassêmicos, sujeito 4 β^+ -talassêmico e sujeitos 7 e 10 Controles.

Ig – Imunoglobulinas; Apo-Tf – Apo-transferrina que não contém átomos de ferro; Tf-Fe – Transferrina monoférrica com um átomo de ferro ligado na porção carboxi-terminal; Fe-Tf – Transferrina monoférrica com um átomo de ferro ligado na porção amino-terminal; x – proteína não identificada; Fe₂-Tf – Transferrina diférrica.

3.9 Proteína C Reativa (CRP)

Os níveis séricos da CRP foram determinados pelo método Imunoquimioluminescente, utilizando o kit *Immulite High Sensitivity CRP*, Siemens™ e o equipamento Immulite 1-DPC™, Inglaterra, seguindo as instruções dos fabricantes.

3.10 Avaliação da Eritropoese

3.10.1 Eritropoetina

Os níveis de eritropoetina foram mensurados no soro pelo método ELISA, utilizando kit *Quantikine Human EPO Immunoassay*, da R&D Systems™ e o equipamento leitor de ELISA da Thermo Scientific™, MultiiSkan GO versão 2.

3.10.2 Fator de diferenciação do crescimento 15

Os níveis séricos de GDF15 foram determinados pelo método ELISA, utilizando kit *Quantikine Human GDF-15 Immunoassay*, da R&D Systems™ e o equipamento leitor de ELISA da Thermo Scientific™, MultiiSkan GO versão 2.

3.11 Hepcidina

A determinação dos níveis de hepcidina esteve sob a responsabilidade dos pesquisadores Dr Mark Westerman e Dr^a Gordana Olbina da *Intrinsic LifeSciences*, La Jolla, EUA. O método utilizado é ELISA, utilizando kit fabricado pela referida empresa.

3.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad, Software Incorporated, Prism, versão 5.02. Devido distribuição não normal, os parâmetros foram log-transformados para aproximar a uma distribuição normal, procedimento padronizado que possibilita a análise paramétrica de distribuição não normal (BLACKWOOD, 1992; VICKERS, 2005).

A média geométrica foi calculada pela exponenciação da média aritmética das variáveis log-transformadas (BLACKWOOD, 1992). Devido diferenças entre os gêneros, as análises foram conduzidas de forma estratificada. As análises entre os grupos foram avaliadas pelo teste One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla Dunnett. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança. Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$ (Tabelas 1-5). As correlações entre hepcidina e demais variáveis (Tabela 6) e as entre GDF15 e demais variáveis (Tabela 7) foram analisadas pelo teste paramétrico de Pearson.

As figuras 12 e 13 apresentam, respectivamente, os fluxogramas dos experimentos realizados no Brasil e nos Estados Unidos.

Figura 12 – Fluxograma dos experimentos realizados no Brasil.

Figura 13 – Fluxograma dos experimentos realizados nos Estados Unidos da América.

4. RESULTADOS

Participaram do estudo 226 adultos da cidade de Ribeirão Preto - SP, com idade entre 18 e 68 anos, sendo 75 (33,2%) do gênero feminino e 151 (66,8%) do gênero masculino. Não houve diferença significativa entre a média geométrica das idades dos gêneros feminino (33,18 anos $\pm$ 10,9) e masculino (34,67 anos $\pm$ 11,6) (Figura 14A).

Após utilizar os critérios de exclusão, 112 adultos foram organizados nos 5 grupos de estudo, sendo 45 (40,2%) do gênero feminino e 67 (50,8%) do gênero masculino. Não houve diferença significativa entre a média geométrica das idades dos gêneros feminino (33,12 anos $\pm$ 11,1) e masculino (33,52 anos $\pm$ 12,6) (Figura 14B).

Figura 14 - Distribuição dos sujeitos da pesquisa segundo a idade e o gênero. A) Indivíduos recrutados para pesquisa (n=226); gênero feminino (n=75, idade média 33,18 $\pm$ 10,9); gênero masculino (n=151, idade média 34,67 $\pm$ 11,6). B) Indivíduos selecionados que compuseram os 5 grupos de estudo (n=112); gênero feminino (n=45, idade média 33,12 $\pm$ 11,1); gênero masculino (n=67, idade média 33,52 $\pm$ 12,6). Teste t não pareado.

O grupo Controle foi composto por 28 indivíduos, doadores de sangue pela primeira vez, e que apresentaram todos os parâmetros analisados dentro da faixa de normalidade (Anexo D).

Dentre os doadores de sangue foram identificados 27 indivíduos portadores de desordens da síntese de hemoglobina, a saber: 15 (8,47%) com α^+ -talassemia heterozigota, 7 (3,95%) deficientes de ferro, 4 (2,26%) com anemia por deficiência de ferro e 1 (0,565%) portador do traço falcêmico. Somente os pacientes com talassemia foram objeto de estudo nesta pesquisa.

Os portadores de talassemias foram divididos em três grupos de estudo: α^+ -talassemia heterozigota (TAT, n=14), β^+ -talassemia (traço β -talassêmico, TBT, n=20) e β^0 -talassemia (β -talassemia maior, BTM, n=27), não tendo sido incluídos nestes grupos pacientes que apresentavam síndromes metabólicas e/ou quadro laboratorial indicativo da presença de infecção. Os pacientes com α^+ -talassemia heterozigota foram diagnosticados entre os indivíduos aparentemente saudáveis, grupo composto por doadores regulares e primeira vez.

A confirmação do diagnóstico dos portadores de β^+ -talassemia foi realizada por HPLC, tendo sido verificado o aumento da hemoglobina A2 nestes indivíduos (Apêndice B).

Nos indivíduos β -talassêmicos, foi realizada a pesquisa da deleção $\alpha^{-3,7}$ para descartar a coexistência de $\alpha\beta$ -talassemia. Foi identificado um único paciente que foi excluído da pesquisa.

Foi composto ainda um quinto grupo de estudo (n=23) por doadores de sangue regulares (DSR) que poderiam apresentar parâmetros de *status* férrico alterado em função das doações frequentes.

Os grupos foram avaliados com relação à idade (Figura 15). Observamos diferença significativa entre as idades somente entre os grupos BTM e Controle do gênero masculino. Os indivíduos do grupo Controle do gênero masculino foram pareados por idade com os do grupo BTM, tendo constatado que a diferença entre idades não afeta a análise dos parâmetros estudados.

Os resultados da avaliação hematológica dos grupos estudados estão apresentados na Tabela 1 e Apêndice C. Observamos as seguintes diferenças significativas, em relação ao Grupo Controle: Grupo TAT, gênero feminino, parâmetro volume corpuscular médio e gênero masculino parâmetros volume corpuscular médio e hemoglobina corpuscular média; Grupo TBT, ambos os gêneros, todos os parâmetros analisados na avaliação hematológica; Grupo BTM, ambos os gêneros, todos os parâmetros analisados na avaliação hematológica com exceção para a concentração de hemoglobina corpuscular média; Grupo DSR, ambos os

gêneros, não apresentou diferença significativa na avaliação hematológica.

Figura 15 – Diferença de idade log-transformada entre os grupos de estudo. A) gênero feminino. B) gênero masculino. DSR (doadores de sangue regulares), TAT (α^+ -talassemia heterozigota), TBT (traço β -talassêmico) e BTM (β -talassemia maior). Teste one-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett. A diferença inicialmente apresentada somente no grupo BTM do gênero masculino deixou de ser significativa para pesquisa após experimento pareando por idade os indivíduos BTM com o grupo Controle.

TABELA 1. Avaliação hematológica dos grupos de estudo.

Parâmetros	Gênero	Controle	DSR	TAT	TBT	BTM
Eritrócitos (10 ¹² /L)	F	4,4 [4,2-4,5]	4,6 [4,4-4,9]	4,6 [4,3-5,0]	5,2*** [5,0-5,4]	3,1*** [2,9-3,3]
	M	5,0 [4,9-5,1]	5,0 [4,9-5,1]	5,1 [4,7-5,5]	5,9*** [5,5-6,4]	3,3 *** [3,2-3,5]
Hb (g/dL)	F	13,0 [12,6-13,5]	13,7 [12,9-14,7]	12,9 [12,1-13,8]	10,8*** [10,4-11,3]	8,8*** [8,4-9,2]
	M	15,2 [14,8-15,5]	15,4 [15,1-15,8]	14,3 [13,2-15,4]	12,1*** [11,5-12,8]	9,4*** [9,0-9,9]
Hct (%)	F	38,8 [37,4-40,2]	40,5 [38,4-42,7]	38,7 [36,2-41,4]	34,4*** [33,1-35,7]	26,1*** [24,7-27,6]
	M	44,7 [43,5-46,0]	45,5 [44,6-46,5]	42,9 [39,7-46,3]	38,7*** [36,0-41,5]	27,5*** [26,1-29,1]
VCM (fL)	F	89,1 [87,1-91,3]	87,5 [84,3-90,9]	83,3* [80,2-86,7]	66,5*** [64,3-68,9]	83,9** [81,9-86,0]
	M	89,7 [88,6-90,9]	90,6 [88,9-92,4]	84,9*** [82,1-87,6]	65,2*** [63,2-67,3]	82,6*** [81,2-84,1]
HCM (pg)	F	30,0 [29,2-30,8]	29,7 [28,4-31,2]	27,9 [26,9-28,9]	21,2*** [20,0-22,4]	28,4 [27,7-29,2]
	M	30,4 [29,8-31,0]	30,7 [30,0-31,5]	28,2** [26,9-29,5]	20,4*** [19,8-21,1]	28,2*** [27,1-29,4]
CHCM (g/dL)	F	33,7 [33,3-34,1]	34,0 [33,1-34,9]	33,4 [33,0-33,8]	31,8*** [31,0-32,6]	33,8 [33,2-34,5]
	M	33,8 [33,4-34,3]	33,9 [33,4-34,4]	33,3 [32,5-34,0]	31,3*** [30,7-31,8]	34,1 [33,1-35,2]
RDW (%)	F	11,1 [10,7-11,5]	10,9 [10,2-11,7]	11,7 [10,6-12,9]	13,0*** [12,4-13,8]	14,0*** [13,0-15,1]
	M	11,2 [10,9-11,5]	11,1 [10,8-11,4]	11,1 [10,7-11,6]	13,1** [12,6-13,6]	13,9*** [12,5-15,4]

Grupo Controle, 28 adultos (F=11 e M=17); DSR, doadores de sangue regulares, 23 adultos (F=5 e M=18); TAT, α^+ -talassemia heterozigota, 14 adultos (F=5 e M=9); TBT, traço β -talassêmico, 20 adultos (F=12 e M=8); BTM, β -talassemia maior, 27 adultos (F=12 e M=15); IC, intervalo de confiança; Hb, hemoglobina; Hct, hematócrito; VCM, volume corpuscular médio; HCM, hemoglobina corpuscular média; CHCM, concentração de hemoglobina corpuscular média e RDW, do inglês red cell distribution width, indica a variação de tamanho dos eritrócitos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, comparados ao Controle. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança.

Os resultados dos parâmetros utilizados nas avaliações do metabolismo do ferro e eritropoese estão apresentados no Apêndice D.

Na análise do *status* férrico dos Grupos de estudo comparados ao Grupo Controle verificamos diferenças significantes nos grupos: TAT do gênero masculino para os parâmetros saturação de transferrina, sTfR e índice sTfR/log ferritina; TBT, ambos os gêneros, para os parâmetros sTfR e índice sTfR/log ferritina e somente no gênero masculino

também para a concentração sérica de ferritina; BTM, ambos os gêneros, em todos os parâmetros com exceção para a capacidade total de ligação ao ferro; DSR somente para o parâmetro saturação de transferrina (Tabela 2).

TABELA 2. Status férrico dos grupos de estudo.

Parâmetros	Gênero	Controle	DSR	TAT	TBT	BTM
Ferro sérico (µg/dL)	F	108 [80,5-145]	108 [37,2-314]	96,4 [53,0-176]	97,0 [81,8-115,1]	222*** [194-253]
	M	88,8 [75,9-104]	105 [90,1-123]	119 [102-139]	100 [72,5-138]	225*** [193-263]
CTLF (µg/dL)	F	281 [211-374]	356 [204-621]	286 [232-352]	283 [261-306]	317 [260-387]
	M	276 [255-298]	249 [234-264]	241 [205-283]	246 [230-263]	336 [270-419]
%Tsat	F	38,5 [32,3-45,9]	30,3 [16,5-55,5]	33,8 [22,3-51,1]	34,3 [28,4-41,4]	69,8*** [61,2-79,6]
	M	32,3 [27,6-37,8]	42,3* [36,1-49,5]	49,4** [38,8-62,9]	40,6 [28,5-58,0]	66,9*** [57,9-77,3]
Ferritina (ng/mL)	F	68,0 [51,2-90,3]	55,0 [35,2-85,9]	34,7 [8,6-140,6]	91,8 [41,8-201,5]	1788*** [970,7-3298]
	M	150 [115-194]	110 [81,9-147]	133 [82,9-214]	345** [210-566]	2662*** [1982-3572]
sTfR (mg/L)	F	1,5 [1,3-1,6]	1,3 [0,9-1,8]	2,1 [1,6- 2,9]	3,9*** [3,1-4,9]	12,9*** [8,9-18,7]
	M	1,3 [1,2-1,6]	1,6 [1,4-1,7]	2,1* [1,5- 2,8]	5,6*** [3,9-8,0]	12,6*** [9,4-17,1]
sTfR/log Ferritina	F	0,80 [0,70-0,93]	0,72 [0,53-0,99]	1,45 [0,97-2,16]	2,06*** [1,41-3,00]	3,99*** [2,64-6,03]
	M	0,62 [0,53-0,71]	0,78 [0,70-0,87]	0,98* [0,70-1,38]	2,23*** [1,54-3,22]	3,70*** [2,71-5,07]

Grupo Controle, 28 adultos (F=11 e M=17); DSR, doadores de sangue regulares, 23 adultos (F=5 e M=18); TAT, α^+ -talassemia heterozigota, 14 adultos (F=5 e M=9); TBT, traço β -talassêmico, 20 adultos (F=12 e M=8); BTM, β -talassemia maior, 27 adultos (F=12 e M=15); IC, intervalo de confiança; CTLF, capacidade total de ligação do ferro; %Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, comparados ao Controle. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança.

A figura 13 e a tabela 3 ilustram a distribuição das frações de transferrina nos grupos de estudo. O grupo BTM foi o único que apresentou diferenças significantes para as frações de transferrina. Os grupos TBT e TAT demonstraram respectivamente tendência similar e

contrária ao grupo BTM para as frações monoférrica e diférrica (Tabela 3).

Figura 16 – Distribuição das frações de transferrina nos grupos de estudo. As frações são calculadas em porcentagem e a soma das quatro frações representam o total da transferrina sérica. Grupo Controle (n=12); DSR, doadores de sangue regulares (n=10); TAT, α^+ -talassemia heterozigota (n=9); TBT, traço β -talassêmico (n=17); BTM, β -talassemia maior (n=15); Tf, transferrina. Apo, transferrina sem átomos de ferro; Tf-Fe, transferrina monoférrica cujo átomo de ferro está ligado à porção C-terminal; Fe-Tf, transferrina monoférrica cujo átomo de ferro está ligado à porção N-terminal; Fe2-Tf, transferrina diférrica. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados ao Controle.

TABELA 3. Frações de transferrina dos grupos de estudo

Frações	Controle	DSR	TAT	TBT	BTM
Apo Tf	35,91 [24,36-52,93]	47,09 [35,73-61,99]	42,35 [31,82-56,43]	41,06 [27,41-61,50]	12,62** [5,25-30,30]
Tf-monoférrica	37,00 [26,08-52,56]	40,13 [35,23-45,70]	48,76 [38,21-62,30]	24,98 [18,78-33,18]	9,97** [3,99-24,88]
Tf-diférrica	8,24 [3,43-19,81]	3,55 [1,01-12,43]	2,76 [1,01-7,59]	13,36 [7,65-23,31]	38,09* [21,05-68,92]
mono/diférrica	2,36 [0,99-5,64]	7,54 [2,96-19,22]	11,92 [7,05-20,15]	1,86 [0,87-3,97]	0,37* [0,11-1,26]

Grupo Controle (n=12); DSR, doadores de sangue regulares (n=10); TAT, α^+ -talassemia heterozigota (n=9); TBT, traço β -talassêmico (n=17); BTM, β -talassemia maior (n=15); IC, intervalo de confiança; Tf, transferrina. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, comparados ao Controle. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança.

TABELA 4. Avaliação da eritropoese dos grupos de estudo.

Parâmetros	Gênero	Controle	DSR	TAT	TBT	BTM
Epo (mU/mL)	F	3,3 [2,2-5,0]	2,8 [1,5-5,0]	3,8 [2,3-6,0]	8,5*** [6,0-11,8]	70,5*** [50,4-98,5]
	M	3,6 [2,2-5,8]	4,5 [3,2-6,4]	4,7 [3,7-6,0]	7,7 [4,0-14,8]	78,3*** [55,9-109,5]
GDF15 (pg/mL)	F	334 [231-484]	367 [176-764]	538 [116-2484]	373 [270-515]	8902*** [6,217-12,746]
	M	375 [296-475]	347 [289-417]	358 [252-507]	953*** [482-1889]	11464*** [8,769-14,988]

Grupo Controle, 28 adultos (F=11 e M=17); DSR, doadores de sangue regulares, 23 adultos (F=5 e M=18); TAT, α^+ -talassemia heterozigota, 14 adultos (F=5 e M=9); TBT, traço β -talassêmico, 20 adultos (F=12 e M=8); BTM, β -talassemia maior, 27 adultos (F=12 e M=15); IC, intervalo de confiança; Epo, eritropoetina; GDF15, do inglês growth differentiation factor 15, que significa fator diferencial do crescimento. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, comparados ao Controle. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança.

Na avaliação da eritropoese, o grupo TBT apresentou diferença significativa, em relação ao controle, exclusivamente no gênero feminino para o parâmetro eritropoetina e no gênero masculino para o parâmetro GDF15, BTM apresentou diferença significativa em todos os parâmetros analisados e o grupo DSR não apresentou diferença significativa (Tabela 4).

Quanto aos níveis de hepcidina e a razão com outros parâmetros do status férrico, detectamos diferença significativa dos seguintes grupos de estudo, em relação ao Grupo Controle: TAT do gênero masculino para a concentração sérica de hepcidina e para a razão (hepcidina/ferritina)/sTfR; TBT para a razão (hepcidina/ferritina)/sTfR; BTM para as razões hepcidina/ferritina e (hepcidina/ferritina)/sTfR; DSR não apresentou diferença significativa (Tabela 5).

TABELA 5. Avaliação da hepcidina dos grupos de estudo.

Parâmetros	Gênero	Controle	DSR	TAT	TBT	BTM
Hep (ng/mL)	F	42,6 [32,8-55,2]	61,7 [42,9-88,8]	27,5 [8,2-92,6]	64,6 [47,1-88,5]	46,4 [28,0-76,9]
	M	81,7 [69,6-95,9]	53,5 [44,3-64,6]	46,0* [27,1-78,1]	115 [75,9-174]	56,5 [37,3-85,5]
Hep/Ft	F	0,63 [0,49-0,79]	1,12 [0,77-1,63]	0,79 [0,27-2,35]	0,70 [0,41-1,20]	0,026*** [0,018-0,036]
	M	0,55 [0,44-0,68]	0,49 [0,36-0,67]	0,34 [0,24-0,49]	0,33 [0,19-0,60]	0,021*** [0,014-0,032]
(Hep/Ft)/ sTfR	F	0,43 [0,35-0,53]	0,89 [0,58-1,39]	0,37 [0,11-1,19]	0,18 * [0,11-0,29]	0,002*** [0,001-0,003]
	M	0,40 [0,31-0,53]	0,31 [0,22-0,43]	0,17* [0,10-0,29]	0,06*** [0,03-0,11]	0,002*** [0,001-0,004]

Grupo Controle, 28 adultos (F=11 e M=17); DSR, doadores de sangue regulares, 23 adultos (F=5 e M=18); TAT, α^+ -talassemia heterozigota, 14 adultos (F=5 e M=9); TBT, traço β -talassêmico, 20 adultos (F=12 e M=8); BTM, β -talassemia maior, 27 adultos (F=12 e M=15); IC, intervalo de confiança; Hep, hepcidina; Ft, ferritina. As análises estatísticas foram realizadas utilizando One-way ANOVA e pós-teste de comparação múltipla de Dunnett, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparados ao Controle. Os dados foram apresentados como média geométrica e 95% de intervalo de confiança.

Ao examinar a correlação entre hepcidina e fatores potenciais que influenciam sua síntese (Tabela 6), pudemos verificar que em todos os grupos há correlação positiva entre

hepcidina e ferritina. No grupo TBT, a hepcidina também apresenta correlação positiva com GDF15. No grupo BTM, a hepcidina apresenta correlação negativa com os demais fatores analisados: ferro sérico, GDF15, eritropoetina e receptor solúvel de transferrina.

TABELA 6. Correlação entre hepcidina e fatores potenciais que influenciam sua síntese em cada grupo de estudo.

Correlação	Controle		DSR		TAT		TBT		BTM	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
Hep vs. Ferro	-0,150	0,446	0,280	0,195	-0,100	0,733	-0,027	0,909	-0,387	0,046
Hep vs. Ferritina	0,749	<0,0001	0,139	0,528	0,711	0,004	0,771	<0,0001	0,639	0,0003
Hep vs. GDF15	0,165	0,401	0,224	0,305	0,385	0,174	0,481	0,032	-0,493	0,009
Hep vs. Epo	0,068	0,732	0,017	0,938	0,402	0,154	-0,280	0,232	-0,388	0,045
Hep vs. sTfR	0,176	0,370	0,061	0,780	-0,268	0,353	0,118	0,621	-0,484	0,010

Grupo Controle (n=28); DSR, doadores de sangue regulares (n=23); TAT, α^+ -talassemia heterozigota (n=14); TBT, traço β -talassêmico (n=20); BTM, β -talassemia maior (n=27); Hep, hepcidina; GDF15, fator de diferenciação do crescimento 15; Epo, eritropoetina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; r, coeficiente da correlação de Pearson; p, significância estatística. Quando significativo, resultado destacado em negrito. As análises estatísticas foram realizadas utilizando correlação paramétrica de Pearson e significância estatística quando $p < 0,05$.

Figura 17 – Correlação entre razão hepcidina/ferritina e o receptor solúvel de transferrina. A) Ctrl, Controle (n=28); DSR, doadores de sangue regulares (n=23); TAT, α^+ -talassemia heterozigota (n=14); TBT, traço β -talassêmico (n=20) e BTM, β -talassemia maior (n=27). Círculos em A representam a distribuição dos grupos de estudo em B. B) Distribuição dos grupos de estudo: Controle (círculos abertos); DSR (asteriscos); TAT (losangos fechados); TBT (triângulos abertos) e BTM (círculos fechados). O baixo valor da razão hepcidina/ferritina representa maior concentração de ferro, indicado pela seta ascendente na distribuição dos indivíduos nos grupos de estudo.

Na representação gráfica da razão hepcidina/ferritina e o receptor solúvel de transferrina foi possível observar a distinção entre os grupos de estudo (Figura 14). Quanto maior os níveis séricos de receptor solúvel de transferrina, maior expansão eritropoética o grupo apresenta (Figura 14A). A distribuição dos indivíduos por grupo de estudo pode ser visualizado na Figura 14B e a razão hepcidina/ferritina é inversamente proporcional à absorção de ferro, demonstrado pela seta ascendente, estando o grupo Controle na parte inferior esquerda do gráfico e BTM na parte superior direita.

TABELA 7. Correlação entre GDF15 e fatores potenciais que influenciam a eritropoese em cada grupo de estudo.

Correlação	Controle		DSR		TAT		TBT		BTM	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
GDF15 vs. sTfR	0,206	0,293	0,038	0,883	0,054	0,853	0,527	0,017	0,409	0,034
GDF15 vs. Epo	0,133	0,499	-0,108	0,623	0,356	0,211	0,328	0,158	0,436	0,023
GDF15 vs. Hep/Ft	0,109	0,582	-0,282	0,192	0,208	0,475	-0,080	0,738	-0,474	0,012

Grupo Controle (n=28); DSR, doadores de sangue regulares (n=23); TAT, α^+ -talassemia heterozigota (n=14); TBT, traço β -talassêmico (n=20); BTM, β -talassemia maior (n=27); GDF15, fator de diferenciação do crescimento 15; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Epo, eritropoetina; Hep/Ft, razão entre hepcidina e ferritina; r, coeficiente da correlação de Pearson; p, significância estatística. Quando significativo, resultado destacado em negrito. As análises estatísticas foram realizadas utilizando a correlação paramétrica de Pearson e significância estatística quando $p < 0,05$.

A correlação entre GDF15 e fatores potenciais que influenciam a eritropoese (Tabela 7), não foi significativa nos grupos Controle, DSR e TAT. No grupo TBT, GDF15 apresentou correlação positiva com o receptor de transferrina solúvel. No grupo BTM, GDF15 apresentou correlação positiva com o receptor de transferrina solúvel, eritropoetina e correlação negativa com a razão hepcidina/ferritina.

5. DISCUSSÃO

As síndromes talassêmicas sintomáticas representam as causas mais comuns de eritropoese ineficaz. Nestas síndromes, desbalanço na produção das cadeias α - e β -globínicas resultam em aumento de apoptose durante a maturação dos eritroblastos. Sobrecarga de ferro é a principal causa de mortalidade e morbidade associada às talassemias. A deposição de ferro ocorre em órgãos viscerais, principalmente coração, fígado e glândulas endócrinas, causando danos nos tecidos e finalmente disfunção (RUND; RACHMILEWITZ, 2005; VICHINSKY, 2013).

A prevalência das talassemias entre adultos na região sudeste é elevada, sendo de 9 a 12% para α^+ -talassemia heterozigota (MELO et al., 2008; TAVARES et al., 2011; ZAMARO; HIDALGO; BONINI-DOMINGOS, 2003) e de 1,3% para o traço β -talassêmico (RAMALHO et al., 1999). Em nosso estudo, foram identificados 15 indivíduos (8,47%) com α^+ -talassemia heterozigota, enquanto a comum deficiência de ferro foi menos prevalente, 7 indivíduos (3,95%). Esses dados demonstram que, no contexto da saúde pública, é necessário dar mais atenção à α -talassemia.

As principais alterações nas síndromes talassêmicas ocorrem na eritropoese e no metabolismo do ferro. A hepcidina, descoberta em 2001, somente foi relacionada ao metabolismo do ferro em 2005, participando no controle negativo de sua absorção. Vários estudos investigaram a correlação entre eritropoese e metabolismo do ferro em pacientes com β -talassemia maior (GARDENGHI; RIVELLA, 2012; GINZBURG; RIVELLA, 2011; ORIGA et al., 2007; PASRICHA et al., 2013), entretanto o mecanismo molecular responsável pela comunicação entre demanda de ferro e eritropoese continua não completamente elucidado.

Como não há informação sobre alterações na eritropoese e metabolismo do ferro nos portadores de α^+ -talassemia heterozigota e traço β -talassêmico, esta pesquisa teve por objetivo avaliar essas alterações e de que forma elas contribuem na patogenia das talassemias. Para tanto, foram avaliados indivíduos com α^+ -talassemia, β^+ -talassemia e β^0 -talassemia que foram comparados a doadores de sangue pela primeira vez e doadores regulares.

Os doadores de sangue regulares, indivíduos que doam sangue de forma regular, compuseram um grupo diferente do Controle. Essa separação se fez necessária, pois trabalhos prévios observaram alterações nas dosagens de hepcidina e ferritina. Redução nos níveis séricos de hepcidina e diferentes níveis de ferritina foram relatados por estudos prévios (MAST et al., 2008; MAST et al., 2013; PEFFER et al., 2013).

5.1 Avaliação hematológica

A realização da avaliação hematológica foi importante, pois apesar de algumas alterações serem esperadas, (CLARKE; HIGGINS, 2000; GALANELLO; ORIGA, 2010; VICHINSKY, 2013) os parâmetros foram úteis para caracterizar os grupos de estudo.

Os indivíduos TAT do gênero feminino exibiram volume corpuscular médio menor que o do grupo controle ($p > 0,05$), enquanto os do gênero masculino apresentaram redução mais significativa ($p < 0,001$) para o VCM e diminuição da hemoglobina corpuscular média ($p < 0,01$) (Tabela 1). O valor desses parâmetros estava dentro dos limites de normalidade, entretanto o valor foi semelhante aos dos pacientes BTM que retornam a clínica para a realização de transfusão sanguínea. Portanto, valores de VCM e HCM próximos ao limite inferior devem ser melhor investigados para esclarecer se representam realmente indivíduos saudáveis ou fase inicial de alteração na atividade eritropoética. A redução do VCM e HCM encontrada no grupo TAT também foi relatada em outros estudos, na população brasileira, que avaliaram indivíduos com genótipo $-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$ (ALCOFORADO et al., 2012; SOUZA et al., 2009; WAGNER et al., 2010).

Muitos indivíduos com deleção de somente um α -gene não são identificados durante avaliação hematológica, tendo em vista que os parâmetros analisados apresentam muito próximos aos valores limítrofes de normalidade. Entretanto, Souza et al. (2009) e Wagner et al. (2010) demonstraram, respectivamente, que 19,4% e 22,8% dos casos de anemia microcítica hipocrômica ocorreram devido deleção $-\alpha^{3,7}$ heterozigota ($-\alpha^{3,7}/\alpha\alpha$), enquanto os casos de microcitose e hipocromia sem anemia devido a mesma deleção foi de 42,8% (BORGES et al., 2001). Esses estudos demonstram a necessidade de realizar avaliação mais acurada dos portadores de α^+ -talassemia heterozigota.

No grupo TBT, houve alteração de múltiplos parâmetros da avaliação hematológica, a saber, concentração de hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM e CHCM diminuídos e número de eritrócitos e RDW aumentados, em ambos os gêneros (Tabela 1), confirmando os dados da literatura (DEMIR et al., 2004; GALANELLO; ORIGA, 2010; MATOS et al., 2013; URRECHAGA, 2009). O aumento do número de eritrócitos reflete o aumento da expansão eritropoética subsequente à anemia hemolítica causada pelo desbalanço da produção das cadeias globínicas. Como a síntese de hemoglobina A está reduzida, a medula óssea dos pacientes TBT produz eritrócitos microcíticos, porém funcionais. Por esse motivo, a transfusão sanguínea não se faz necessária nos pacientes com β -talassemia menor.

No grupo BTM, o RDW está aumentado e todos os demais parâmetros do hemograma reduzidos, com exceção de HCM no gênero feminino, e CHCM em ambos os gêneros, dados

estes compatíveis com a gravidade desta patologia (Tabela 1) e muito bem caracterizados na literatura. O aumento do RDW (Tabela 1) reflete anisocitose, alteração do tamanho do eritrócito, e a redução do VCM e HCM pode ser visualizada na extensão sanguínea por eritrócitos microcíticos e levemente hipocrômicos, respectivamente; também é possível relatar poiquilocitose, com presença de eliptócitos, dacriócitos e células alvo.

O desbalanço da produção das cadeias globínicas em BTM é ainda mais acentuado do que ocorre em TBT e, por esse motivo, é comum o aumento da globina γ na tentativa de compensar o excesso da globina α , elevando a hemoglobina fetal (BAUER; ORKIN, 2012). Entretanto, mesmo com o aumento da hemoglobina fetal, o excesso de globinas α forma agregados denominados hemicromos que ativam apoptose resultando em anemia hemolítica grave. Neste grupo, houve redução do número de eritrócitos, Hb e Htc (Tabela 1). Na extensão sanguínea, foi observada a presença de grande número de eritroblastos ortocromáticos, pequeno número de policromáticos e raros casos de eritroblastos basófilos, indicando que a maturação não é eficiente, o que caracteriza eritropoese ineficaz. Devido à ausência de eritrócitos funcionais, os pacientes BTM recebem transfusão de concentrado de hemácias, em média, uma vez por mês.

5.2 Status férrico

Os marcadores bioquímicos comumente usados para avaliar o *status* férrico incluem ferritina, ferro sérico e saturação de transferrina. Nos anos 90, foi introduzido um novo parâmetro, o receptor de transferrina solúvel, utilizado para detectar mudanças precoces no *status* férrico, sendo importante sua inclusão aos marcadores tradicionais (TUSSING-HUMPHREYS et al., 2011).

O índice sTfR/log ferritina foi inicialmente utilizado para distinguir anemia deficiente de ferro das outras anemias. Suominen et al. (1998) demonstraram que o índice também é eficiente para detectar precocemente a depleção dos estoques de ferro, primeiro estágio da deficiência de ferro, e a eritropoese deficiente de ferro, segundo estágio. Quando os resultados do receptor de transferrina solúvel e ferritina são ambíguos, o índice sTfR/log ferritina é mais sensível para a detecção dos estados da deficiência de ferro.

Pacientes talassêmicos apresentam absorção de ferro intestinal aumentada proporcional à atividade eritropoética. Em pacientes β^0 -talassêmicos, a hiperplasia da medula óssea é suprimida pelas transfusões (KATTAMIS et al., 2006).

Os indivíduos do gênero masculino do grupo TAT exibiram aumento na concentração

do receptor de transferrina solúvel, na saturação de transferrina e no índice sTfR/log ferritina, enquanto os do gênero feminino demonstraram uma tendência similar, apesar do aumento não ser significativo (Tabela 2). Quando a análise estatística foi realizada sem separação dos gêneros, o aumento permaneceu significativo ($p < 0,01$), comprovando que a alteração ocorre.

Rees et al. (1998) demonstraram que a α -talassemia está associada ao aumento do receptor solúvel de transferrina; apesar dos grupos não terem sido separado conforme o gênero, 60% do grupo com α^+ -talassemia heterozigota era do gênero masculino. A literatura relata os “portadores silenciosos” da α -talassemia como assintomáticos (GALANELLO et al., 2012; VICHINSKY et al., 2012), porém como o aumento dos níveis do sTfR indica expansão eritropoética e, como foi observado aumento da saturação de transferrina (Tabela 2), indicando maior mobilização de ferro para eritropoese, nossos resultados demonstram que alterações discretas no metabolismo de ferro já ocorrem nesses indivíduos.

No grupo TBT foi observado aumento na concentração do sTfR (Tabela 2). Resultados semelhantes foram observados por Khatami et al. (2013) e ONG et al. (2008). O índice sTfR/log Ferritina está aumentado em ambos os gêneros e a ferritina sérica aumentada no gênero masculino, demonstrando aumento da absorção intestinal de ferro em consequência da maior demanda para a atividade eritropoética. A ferritina sérica no gênero feminino apresenta uma tendência similar, embora sem significância, provavelmente devido às perdas menstruais.

Todos os parâmetros do *status* férrico, com exceção de CTLF, no grupo BTM estão aumentados (Tabela 2). O aumento do ferro sérico, %Tsat e ferritina podem ser explicados pelas transfusões recorrentes e adicional aumento na absorção de ferro devido eritropoese ineficaz (MUSALLAM et al., 2013; RIVELLA et al., 2012), conforme evidenciado pelo acentuado aumento da concentração sérica do sTfR e índice sTfR/log ferritina.

O grupo DSR do gênero masculino apresentou saturação de transferrina em níveis mais altos que os Controles do mesmo gênero, o que sugere que a doação de sangue regular altera a relação entre os parâmetros do metabolismo do ferro (MAST et al., 2013). Por essa razão, somente doadores pela primeira vez foram selecionados para o grupo Controle. Apesar da diferença na saturação da transferrina (Tabela 2), as proporções das frações de transferrina não estão alteradas (Tabela 3).

O grupo BTM foi o único que apresentou diferenças significantes para as frações de transferrina (Figura 13 e Tabela 3). Devido sobrecarga de ferro, a distribuição das frações de transferrina é alterada, reduzindo a concentração da apo-transferrina e aumentando a concentração da transferrina diférrica. Em alguns pacientes a transferrina está completamente saturada.

O grupo TBT demonstrou aumento da fração diférrica, embora sem significância, similar ao grupo BTM. O aumento de ferro no grupo TBT é devido eritropoese ineficaz que reduz a síntese de hepcidina ocasionando aumento na absorção intestinal. Trabalhos recentes demonstraram que pacientes não dependentes de transfusão podem desenvolver sobrecarga de ferro devido eritropoese ineficaz (GANZ; NEMETH, 2012; MUSALLAM et al., 2013).

O grupo TAT demonstrou uma distribuição semelhante ao do grupo DSR, indicando que o metabolismo de ferro pode estar levemente comprometido nestes indivíduos.

5.3 – Avaliação da eritropoese

Os níveis de GDF15 têm sido reportados como marcador de eritropoese ineficaz (MUSALLAM et al., 2011; TANNO et al., 2007), enquanto a eritropoetina (BUNN, 2013) é o principal regulador da eritropoese. O aumento da atividade eritropoética eleva os níveis de sTfR (SPEECKAERT M.; SPEECKAERT R.; DELANGHE, et al., 2011).

O grupo TAT não apresentou diferença significativa nos níveis séricos de eritropoetina e GDF15, quando comparados ao Controle.

No TBT do gênero masculino níveis elevados de GDF15 (Tabela 4) sugerem que o aumento da eritropoese nesses indivíduos está associado a algum grau de eritropoese ineficaz. No TBT do gênero feminino, os níveis séricos de Epo estão aumentados, enquanto os níveis séricos de GDF15 estão no intervalo de normalidade (Tabela 4), sugerindo que a atividade eritropoética possa ser gênero específico.

Pacientes com BTM demonstraram aumento para os níveis séricos de eritropoetina e GDF15 (Tabela 4), juntamente com o aumento do sTfR e índice (sTfR/log ferritina), comentado no item anterior. Esses dados sugerem que, apesar das transfusões de concentrado de hemácias, a expansão eritropoética está presente para compensar a anemia, mas falha devido apoptose provocada pelo excesso de globinas α , característica da eritropoese ineficaz. Trabalhos recentes relataram aumento nos níveis séricos de GDF15 (TANNO et al., 2007) e eritropoetina (PASRICHA et al., 2013) em pacientes com BTM.

5.4 – Avaliação da Hepsidina

A análise dos parâmetros hepcidina, ferritina e sTfR são úteis para avaliar se o balanço entre eritropoese e metabolismo do ferro está alterado. A razão entre hepcidina e ferritina

séricas (hepcidina/ferritina) pode ser utilizada como índice da adequação de hepcidina em resposta à demanda de ferro (ORIGA et al., 2007), enquanto a razão do sTfR e ferritina (sTfR/log ferritina) pode estimar o requerimento funcional de ferro (SKIKNE, 2008).

Combinamos parâmetros relacionados ao metabolismo do ferro como hepcidina e ferritina com o receptor solúvel de transferrina, um marcador de proliferação eritropoética, e determinamos uma equação de fórmula (hepcidina/ferritina)/sTfR (Tabela 5). Este índice pode ser útil para auxiliar os clínicos nas decisões terapêuticas em pacientes diagnosticados com talassemias severas, além de discriminar os portadores do traço talassêmico dos indivíduos saudáveis. Além disso, a razão dos três parâmetros (hepcidina/ferritina)/sTfR pode ser utilizada para avaliar os estímulos contrários (disponibilidade de ferro e atividade eritropoética) que controlam a síntese de hepcidina e a absorção de ferro, na ausência de estímulos inflamatórios.

Apesar do crescente interesse na hepcidina e outros biomarcadores relativamente novos, as diretrizes clínicas recomendam o uso de marcadores tradicionais, como ferritina e transferrina séricas para a completa avaliação e diagnóstico das desordens relacionadas ao ferro (SZOKE; PANTEGHINI, 2012). Para a prática clínica, a avaliação sérica do receptor de transferrina e da hepcidina ainda são inviáveis devido ao alto custo e pouca disponibilidade no mercado.

Os indivíduos TAT do gênero masculino apresentaram redução dos níveis séricos de hepcidina e da razão dos três parâmetros (hepcidina/ferritina)/sTfR (Tabela 5). Estas alterações, não observadas no gênero feminino, sugerem que, nos homens, ocorre aumento mensurável compensatório na eritropoese e, em consequência, supressão da síntese de hepcidina. As mulheres do mesmo grupo não apresentaram alterações significantes para estes parâmetros, embora possa ser observada uma tendência similar (Tabela 5).

A síntese de hepcidina é consequência de sinalização regulatória contrária, por exemplo, diminuição da eritropoese e aumento do estoque de ferro, portanto nas anemias leves ocorre um pequeno efeito supressivo na síntese, o que justifica a concentração de hepcidina no TBT do gênero masculino não ser diferente do grupo Controle do mesmo gênero (Tabela 5). Pequena supressão de hepcidina e aumento da atividade eritropoética resultam em aumento na absorção intestinal de ferro. Isso leva ao aumento dos estoques de ferro no fígado, evidenciado pelo aumento da concentração sérica de ferritina nos TBT do gênero masculino (Tabela 2) e demonstra que o efeito supressivo da hepcidina na eritropoese em expansão, resulta em síntese relativamente normal de hepcidina.

Apesar do aumento da concentração sérica de ferritina nos homens com TBT, a razão

hepcidina/ferritina não é diferente do grupo Controle (Tabela 5) sendo mantida no mesmo alinhamento que este na Figura 14, porém deslocado a direita em consequência do aumento do receptor de transferrina. A presença de marcadores associados ao pequeno grau de eritropoese ineficaz indica com que com o tempo esses indivíduos podem desenvolver sobrecarga de ferro devido à supressão crônica de hepcidina. Estudos adicionais relacionados à avaliação da eritropoese e status férrico incluindo a concentração de ferro nos tecidos são necessários para elucidar essa questão.

O grupo BTM não apresentou alteração nos níveis séricos de hepcidina, entretanto as razões hepcidina/ferritina e (hepcidina/ferritina)/sTfR estão drasticamente reduzidas. A redução da razão hepcidina/ferritina indica que a concentração sérica de hepcidina está desproporcionalmente baixa em relação ao grau de sobrecarga de ferro. Outros estudos observaram a mesma desproporção entre os níveis de hepcidina e ferritina (GARDENGHI et al., 2007; KATTAMIS et al., 2006; ORIGA et al., 2007; PASRICHA et al., 2013). Os valores da razão hepcidina/ferritina séricos em nossas amostras foram muito semelhantes aos relatados em um estudo recente realizado por Pasricha et al., (2013).

Quando a capacidade de ligação ao ferro da transferrina é excedida, o NTBI (*non-transferrin-bound iron*, do inglês) é detectado na circulação. Mesmo com a sobrecarga de ferro nos pacientes com β -talassemia, os níveis de hepcidina não estão aumentados sugerindo que expressão insuficiente de hepcidina seja a causa desta sobrecarga. A hepcidina também está diminuída nos pacientes β -talassêmicos com alta concentração de sTfR, eritropoese aumentada e NTBI circulante e, aumentada nos pacientes com alta concentração de hemoglobina (RUND; RACHMILEWITZ, 2005; LI; GINZBURG, 2010).

Para explicar níveis inapropriadamente normais de hepcidina sérica em pacientes com sobrecarga de ferro na eritropoese ineficaz, estudos tentam avaliar se os níveis de GDF15 modifica ou é modificada pela homeostasia do ferro (CASANOVAS et al., 2013; MUSALLAM et al., 2011; TANNO et al., 2007; TANNO et al., 2010).

5.5 Correlações

As correlações entre hepcidina, ferritina e sTfR foram avaliadas para estimar o grau de absorção de ferro relacionados aos múltiplos fatores do estoque de ferro e atividade eritropoética, controlando a síntese de hepcidina na ausência de inflamação. Essas avaliações juntamente com o índice (hepcidina/ferritina)/sTfR contribuem para monitorar a absorção de ferro e problemas potenciais relacionados ao acúmulo de ferro com o tempo e agravamento da

eritropoese.

A correlação positiva esperada entre hepcidina e ferritina relatada em trabalhos prévios (FERTRIN et al., 2014; KARL et al., 2010; KURAGANO et al., 2010; PIPERNO et al., 2011) somente não ocorre no grupo DSR (Tabela 6).

As doações regulares alteram os níveis séricos de hepcidina e ferritina, consequentemente alterando a correlação entre ambos. Intensa redução nos níveis séricos de hepcidina e diferentes níveis de ferritina foram reportados em doadores regulares (MAST et al., 2008; MAST et al., 2013; PEFFER et al., 2013).

A razão hepcidina/ferritina é um parâmetro que se correlaciona bem com a absorção de ferro (PASRICHA et al., 2011). Mast et al. (2008) levantaram a hipótese que a redução dos níveis séricos de hepcidina ocorra devido aumento dos níveis séricos de GDF15 secundário a expansão eritropoética necessária para a reposição de eritrócitos perdidos nas doações. O grupo DSR desta pesquisa, não apresentou aumento para GDF15 nem alterações dos níveis séricos de ferritina e hepcidina; somente a saturação de transferrina e a correlação entre hepcidina e ferritina estavam alteradas, sugerindo que outros fatores relacionados à necessidade de absorção de ferro e eritropoese influenciam a alteração do metabolismo de ferro nos doadores regulares.

No grupo BTM, a hepcidina correlaciona-se positivamente com ferritina e negativamente com ferro sérico, GDF15, Epo e sTfR (Tabela 6). GDF15 correlaciona-se positivamente com sTfR e Epo, e negativamente com a razão hepcidina/ferritina (Tabela 7). Na tentativa ineficiente do organismo superar a anemia, os níveis séricos dos marcadores de expansão eritropoética GDF15, Epo e sTfR elevam-se marcadamente, inibindo a síntese de hepcidina e, mesmo com a sobrecarga de ferro, os níveis séricos de hepcidina permanecem inapropriadamente baixos. Fertrin et al. (2014) acreditam que a supressão da hepcidina, através da atividade eritropoética, sofre maior influência de sTfR do que GDF15. Aumento dos níveis séricos de GDF15 é associado com eritropoese ineficaz e apoptótica. Tanno et al. (2010) discutem o papel de GDF15 e descrevem p53 como um dos principais fatores de transcrição que regulam a expressão de GDF15.

No grupo TBT, a hepcidina se correlaciona positivamente com GDF15 (Tabela 6), ao contrário do grupo BTM. Provavelmente o aumento inicial de GDF15, Epo (Tabela 4) e sTfR (Tabela 2), devido a anemia leve, não é suficiente para inibir a hepcidina. Mas, à medida que essa anemia se torna mais severa, nos β^0 -talassêmicos, o intenso aumento nos níveis séricos desses fatores passam a correlacionar-se negativamente com hepcidina. GDF15 correlaciona-se positivamente com sTfR da mesma forma que o grupo BTM (Tabela 7).

Os pacientes com BTM demonstraram características consistentes com eritropoese ineficaz, como aumento da proliferação celular eritroide e morte celular sugerida pelo aumento dos níveis séricos de sTfR e GDF15. O metabolismo de ferro anormal (Tabela 2), apesar das terapias transfusão e quelação de ferro, sugerem que terapia adicional é necessária para beneficiar a saúde desses pacientes.

Novas terapias como apo-transferrina, inibidores de Jak2 (do inglês, Janus Kinase 2), oligonucleotídeos antisense para alvo TMPRSS6 (do inglês, Transmembrane Protease Serine 6), minihepcidinas e antagonistas HIF2 α (do inglês, Hypoxia-inducible factor-2-alpha) para reduzir o nível de eritropoese ineficaz e/ou absorção de ferro diminuída estão atualmente disponíveis (ANDERSON et al., 2013; GARDENGHI et al., 2010; GUO et al., 2013; LI et al., 2010; PARROW; GARDENGHI; RIVELLA, 2011).

Os pacientes com α^+ -talassemia heterozigota e, em maior grau, os com β^+ -talassemia demonstraram desbalanço entre a absorção e armazenamento de ferro e a eritropoese. Embora correlações como as delineadas neste estudo, podem não determinar como a doença evolui, as evidências fornecidas sugerem que os pacientes TAT e TBT podem ser beneficiados com a monitorização prospectiva para avaliar se as anormalidades na eritropoese e aumento da absorção de ferro afetam negativamente sua saúde ao longo do tempo.

6. CONCLUSÕES

No estudo sobre alterações no metabolismo de ferro e eritropoese em pacientes com talassemia, verificamos que:

- A ocorrência de desordens na síntese de hemoglobina nos participantes (n=177) foi: 15 (8,47%) com α^+ -talassemia heterozigota, 7 (3,95%) deficientes de ferro, 4 (2,26%) com anemia por deficiência de ferro e 1 (0,56%) portador do traço falcêmico;
- A avaliação hematológica dos grupos de estudo foi condizente com a literatura, mas de suma importância para caracterização dos grupos;
- Indivíduos com α^+ -talassemia heterozigótica apresentaram níveis do sTfR aumentados, que indicam expansão eritropoética;
- Indivíduos com α^+ -talassemia heterozigótica do gênero masculino apresentaram redução dos níveis séricos de hepcidina e da razão dos três parâmetros (hepcidina/ferritina)/sTfR. Estas alterações sugerem que ocorre aumento mensurável compensatório na eritropoese e, em consequência, supressão da síntese de hepcidina. No gênero feminino, estas alterações não foram estatisticamente significantes, embora seja observada uma tendência similar;
- A ferritina e o índice sTfR/log Ferritina estão elevados nos indivíduos com β^+ -talassemia, indicando que pacientes não dependentes de transfusão podem desenvolver sobrecarga de ferro devido eritropoese ineficaz;
- Os portadores de β^+ -talassemia do gênero masculino demonstraram níveis elevados de GDF15, sugerindo que o aumento da eritropoese, nesses indivíduos, está associado a algum grau de eritropoese ineficaz, o que corrobora com a afirmação anterior;
- Pacientes com β^0 -talassemia demonstraram aumento dos níveis séricos de eritropoetina e GDF15 juntamente com o aumento do sTfR e índice sTfR/log ferritina, indicando que, apesar das transfusões de concentrado de hemácias, a expansão eritropoética está presente para compensar a anemia, mas falha devido apoptose provocada pelo excesso de globinas α ;
- Nos β^0 -talassêmicos não houve alteração nos níveis séricos de hepcidina, entretanto as razões hepcidina/ferritina e (hepcidina/ferritina)/sTfR estão drasticamente reduzidas. A redução da razão hepcidina/ferritina indica que a concentração sérica de hepcidina está desproporcionalmente baixa em relação ao grau de sobrecarga de ferro;
- As correlações entre hepcidina, ferritina e sTfR são úteis para estimar o grau de absorção de ferro relacionados aos múltiplos fatores do estoque de ferro e atividade eritropoética controlando a síntese de hepcidina na ausência de inflamação. A

correlação positiva esperada entre hepcidina e ferritina não ocorre nos doadores de sangue. As doações regulares alteram os níveis séricos de hepcidina e ferritina, consequentemente alterando a correlação entre estes parâmetros;

- Na β^+ -talassemia, a hepcidina correlaciona-se positivamente com GDF15. Provavelmente o aumento inicial de GDF15, Epo e sTfR, devido a anemia leve, não é suficiente para inibir a hepcidina. GDF15 também correlaciona-se positivamente com sTfR;
- Nos β^0 -talassêmicos, a hepcidina correlaciona-se positivamente com ferritina e negativamente com ferro sérico, GDF15, Epo e sTfR. GDF15 correlaciona-se positivamente com sTfR e Epo, e negativamente com a razão hepcidina/ferritina. Para compensar a anemia, os níveis séricos dos marcadores de expansão eritropoética GDF15, Epo e sTfR elevam-se marcadamente, inibindo a síntese de hepcidina e, mesmo com a sobrecarga de ferro, os níveis séricos de hepcidina permanecem inapropriadamente baixos;
- **Destacamos que**, pela primeira vez, foram descritas alterações no metabolismo de ferro em indivíduos com α^+ -talassemia heterozigótica. Esses dados demonstram que, no contexto da saúde pública, são necessários identificação e acompanhamento dos portadores de α^+ -talassemia.

7.REFERÊNCIAS

ADORNO, E. V.; COUTO, F. D.; MOURA NETO, J. P.; MENEZES, J. F.; RÊGO, M. REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Hemoglobinopathies in newborns from Salvador, Bahia, Northeast Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 21, n. 1, p. 292-298, Feb. 2005.

ALCOFORADO, G. H. M.; BEZERRA, C. M.; LEMOS, T. M. A. M.; DE OLIVEIRA, D. M.; KIMURA, E. M.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F.; DE MEDEIROS, T. M. Prevalence of α -thalassemia 3.7 kb deletion in the adult population of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 35, n. 3, p. 594-598, July 2012.

ANDERSON, E. R.; TAYLOR, M.; XUE, X.; RAMAKRISHNAN, S. K.; MARTIN, A.; XIE, L.; BREDELL, B. X.; GARDENGHI, S.; RIVELLA, S.; SHAH, Y. M. Intestinal HIF2 α promotes tissue-iron accumulation in disorders of iron overload with anemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.110, n. 50, p. E4922-30, Dec. 2013.

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

ANDRIOPOULOS Jr., B.; CORRADINI, E.; XIA, Y.; FAASSE, S. A.; CHEN, S.; GRGUREVIC, L.; KNUTSON, M. D.; PIETRANGELO, A.; VUKICEVIC, S.; LIN, H. Y.; BABITT, J. L. BMP-6 is a key endogenous regulator of hepcidin expression and iron metabolism. **Nature Genetics**, New York, v. 41, n. 4, p. 482-487, Apr. 2009.

BAUER, D. E.; ORKIN, S. H. Update on fetal hemoglobin gene regulation in hemoglobinopathies. **Current Opinion in Pediatrics**, Philadelphia, v. 23, n. 1, p. 617-632, 2012.

BLACKWOOD, L. G. The Lognormal distribution, environmental data, and radiological monitoring. **Environmental Monitoring and Assessment**, Dordrecht, v. 21, n. 3, p. 193-210, June 1992.

BONINI-DOMINGOS, C. R. **Metodologias Laboratoriais para o diagnóstico de hemoglobinopatias e talassemias**. 1.^a Ed. São José do Rio Preto: HN, 2006. 120 p.

BORGES E., WENNING M. R., KIMURA E. M., GERVÁSIO S. A., COSTA F. F., SONATI M. F. High prevalence of alpha-thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 6, p. 759-62, Jun. 2001.

BREWER, G. J. 2,3-DPG and erythrocyte oxygen affinity. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 25, p. 29–38, 1974.

BUNN, H. F. Erythropoietin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 3, n. 3, p. a011619, 2013.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; GRATTAPAGLIA, D.; SALZANO, F. M.; SALAMONI, S. P.; CROSSETTI, S. G.; FERREIRA, M. E.; HUTZ, M. H. Historical genetics: spatiotemporal analysis of the formation of the Brazilian population. **American Journal of Human Biology**, New York, v. 15, n. 6, p. 824-34, Dec. 2003.

CASANOVAS, G.; SPASIC, M. V.; CASU, C.; RIVELLA, S.; STRELAU, J.; UNSICKER, K.; MUCKENTHALER, M. U. The murine growth differentiation factor 15 is not essential for systemic iron homeostasis in phlebotomized mice. **Haematologica**, Pavia, v. 98, n. 3, p. 444-7, Mar. 2013.

CHUA, A. C.; GRAHAM, R. M.; TRINDER, D.; OLYNYK, J. K. The regulation of cellular iron metabolism. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 44, n. 5-6, p. 413-59, 2007.

CHUNG, J.; WESSLING-RESNICK, M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 40, n. 2, p.151-182, Apr. 2003.

CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. **Clinical chemistry**, Washington, v. 46, n. 8, p. 1284-90, Aug. 2000.

CORRADINI, E.; MEYNARD, D.; WU, Q.; CHEN, S.; VENTURA, P.; PIETRANGELO, A.; BABITT, J. L. Serum and Liver Iron Differently Regulate the Bone Morphogenetic Protein 6 (BMP6)-SMAD Signaling Pathway in Mice. **Hepatology**, Hoboken, v. 54, n. 1, p. 273-284, Jul. 2011.

COOK, J. D.; LIPSCHITZ, D. A.; MILES, L. E.; FINCHE, C. A. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 27, n. 7, p. 681-687, July 1974.

CUNNINGHAM, M. J. Update on thalassemia: clinical care and complications. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 24, n. 1, p. 215-227, Feb. 2010.

DE DOMENICO, I.; MCVEY WARD, D.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, London, v. 9, n. 1, p. 72-81, Jan. 2008.

DE DOMENICO, I.; LO, E.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 10, p. 3800–3805, Mar. 2009.

DEMIR, A.; YARALI, N.; FISGIN, T.; DURU, F.; KARA, A. Serum transferrin receptor levels in beta-thalassemia trait. **Journal of Tropical Pediatrics**, London, v. 50, n. 6, p. 369-71, Dec. 2004.

DODÉ, C.; KRISHNAMOORTHY, R.; LAMB, J.; ROCHETTE, J. Rapid analysis of $\alpha^{3,7}$ thalassaemia and $\alpha\alpha^{anti\ 3,7}$ triplication by enzymatic amplification analysis. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 83, n. 1, p. 105-111, Jan. 1993.

DONOVAN, A.; ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. The ins and outs of iron homeostasis. **Physiology**, Bethesda, v. 21, p. 115-23, Apr. 2006.

EL HAGE CHAHINE, J. M.; HÉMADI, M.; HÁ-DUONG, N. T. Uptake and release of metal ions by transferrin and interaction with receptor 1. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1820, n. 3, p. 334–347, Mar. 2012.

FERTRIN, K. Y.; LANARO, C.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; DE MELLO, M. R. B.; PALLIS, F. R.; BEZERRA, M. A. C.; HATZLHOFFER, B. L. D.; OLBINA, G.; SAAD, S. T. O.; ARAUJO, A. S.; WESTERMAN, M.; COSTA, F. F. Erythropoiesis-driven regulation of hepcidin in human red cell disorders is better reflected through concentrations of soluble transferrin receptor rather than growth differentiation factor 15. **American Journal of Hematology**, New York, v. 89, n. 4, p. 385–390, Apr. 2014.

FIBACH, E., & RACHMILEWITZ, E. A. Does erythropoietin have a role in the treatment of β -hemoglobinopathies? **Hematology/oncology Clinics of North America**, Philadelphia, v. 28, n. 2, p. 249–63, Apr. 2014.

FORGET, B. G.; BUNN, H. F. Classification of the disorders of hemoglobin. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 3, n. 2, p. a011684, Feb. 2013.

FRIED, W. Erythropoietin and erythropoiesis. **Experimental Hematology**, New York, v. 37, n. 9, p.1007–1015, Sept. 2009.

GALANELLO, R. Recent advances in the molecular understanding of non-transfusion-dependent thalassemia. **Blood**, New York, v. 26, Suppl. 1, p. S7–S11, 2012.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, London, v. 5, p. 1-15, May 2010.

GANZ, T. Heparidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. **Blood**, v. 102, n. 3, p. 783–8, Aug. 2003.

GANZ, T. Molecular Control of Iron Transport. **Journal of the American Society of Nephrology**, Washington, v. 18, n. 2, p. 394-400, Feb. 2007.

GANZ, T.; NEMETH, E. Heparidin and iron homeostasis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1823, n. 9, p. 1434-1443, Sept. 2012.

GANZ, T.; OLBINA, G.; GIRELLI, D.; NEMETH, E.; WESTERMAN, M. Immunoassay for human serum heparidin. **Blood**, New York, v. 112, n. 10, p. 4292-97, Nov. 2008.

GARDENGHI, S.; MARONGIU, M. F.; RAMOS, P.; GUY, E.; BREDI, L.; CHADBURN, A.; LIU, Y.; AMARIGLIO, N.; REHAVI, G.; RACHMILEWITZ, E. A.; BREUER, W.; CABANTCHIK, Z. I.; WRIGHTING, D. M.; ANDREWS, N. C.; SOUSA, M.; GIARDINA, P. J.; GRADY, R. W.; RIVELLA, S. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of heparidin and up-regulation of ferroportin. **Blood**, New York, v. 109, n. 11, p. 5027–35, June 2007.

GARDENGHI, S.; RAMOS, P.; MARONGIU, M. F.; MELCHIORI, L.; BREDI, L.; GUY, E.; MUIRHEAD, K.; RAO, N.; ROY, C. N.; ANDREWS, N. C.; NEMETH, E.; FOLLENZI, A.; AN, X.; MOHANDAS, N.; GINZBURG, Y.; RACHMILEWITZ, E. A.; GIARDINA, P. J.; GRADY, R. W.; RIVELLA, S. Heparidin as a therapeutic tool to limit iron overload and improve anemia in β -thalassemic mice. **The Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 120, n. 12, p. 4466–4477, Dec. 2010.

GARDENGHI, S.; RIVELLA, S. New insight on the management of ineffective erythropoiesis and iron overload in β -thalassemia and related hemoglobinopathies. **Hematology Education**, Rotterdam, v. 6, n. 1, p. 331–338, 2012.

GASCHE, C.; LOMER, M. C. E.; CAVILL, I.; WEISS, G. Iron, anaemia and inflammatory bowel diseases. **Gut**, London, v. 53, n. 8, p. 1190-97, Aug. 2004.

GINZBURG, Y.; RIVELLA, S. Beta-thalassemia: a model for elucidation the dynamic regulation of ineffective erythropoiesis and iron metabolism. **Blood**, New York, v. 118, n. 16, p. 4321-30, Oct. 2011.

- GUO, S.; CASU, C.; GARDENGHI, S.; BOOTEN, S.; AGHAJAN, M.; PERALTA, R.; WATT, A.; FREIER, S.; MONIA, B. P.; RIVELLA, S. Reducing TMPRSS6 ameliorates hemochromatosis and β -thalassemia in mice. **Journal of Clinical Investigation**, Ann Arbor, v. 123, n. 4, p. 1531–1541, Apr. 2013.
- HALEY, J. D.; SMITH, D. E.; SCHWEDES, J.; BRENNAN, R.; PEARCE, C.; MOORE, C.; WANG, F.; PETTI, F.; GROSVELD, F.; JANE, S. M.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Identification and characterization of mechanistically distinct inducers of γ -globin transcription. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 66, n. 9, p. 1755-1768, Nov. 2003.
- HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R. Alpha-thalassaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, London, v. 5, n. 5, p. 13, May 2010.
- HIGGS, D. R. The molecular basis of α -thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 3, n. 1, p. a011718, Jan. 2013.
- HILL, R. J.; KONIGSBERG, W.; GUIDOTTI, G.; CRAIG, L. C. The Structure of Human Hemoglobin: the separation of the α and β chains and their amino acid composition. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 237, p. 1549-1554, May 1962.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA ESTATÍSTICA. **Brasil: 500 Anos de Povoamento**. Rio de Janeiro: IBGE, 2000. 232 p.
- IOLASCON, A.; DE FALCO, L.; BEAUMONT, C. Molecular basis of inherited microcytic anemia due to defects in iron acquisition or heme synthesis. **Haematologica**, Pavia, v. 94, n. 3, p. 395-408, Mar. 2009.
- JIMENEZ, C.; LEETS, I.; PUCHE, R.; ANZOLA, E.; MONTILLA, R.; PARRA, C.; AGUILERA, A.; GARCÍA-CASAL, M. N. A single dose of vitamin A improves haemoglobin concentration, retinol status and phagocytic function of neutrophils in preschool children. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 103, n. 6, p. 798-802, Mar. 2010.
- KAN, Y. W. Molecular pathology of α -thalassemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 445, p. 28–36, June 1985.
- KARL, J. P.; LIEBERMAN, H. R.; CABLE, S. J.; WILLIAMS, K. W.; YOUNG, A. J.; MCCLUNG, J. P. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of an iron-fortified food product in female soldiers during military training : relations between iron status , serum

hepcidin , and inflammation. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 92, n. 1, p. 93–100, July 2010.

KATTAMIS, A.; PAPASSOTIRIOU, I.; PALAIOLOGOU, D.; APOSTOLAKOU, F.; GALARI, A.; SAKELLAROPULOS, N.; PAPANIKOLAOU, G. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. **Hematologica**, Pavia, v. 91, n. 6, p. 809–812, June 2006.

KHATAMI, S.; DEHNABEH, S. R.; MOSTAFAVI, E.; KAMALZADEH, N.; YAGHMAEI, P.; SAEEDI, P.; SHARIAT, F.; BAGHERIYAN, H.; ZEINALI, S.; AKBARI, M. T. Evaluation and comparison of soluble transferrin receptor in thalassemia carriers and iron deficient patients. **Hemoglobin**, London, v. 37, n. 4, p. 387–95, Apr. 2013.

KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, London, v. 38, n. 1, p. 61-88, 2003.

KORDAS, K. Iron, lead, and children's behavior and cognition. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 30, p.123-48, Aug. 2010.

KRAUSE, A.; NEITZ, S.; MÄGERT, H-J.; SCHULZ, A.; FORSSMANN, W-G; SCHULZ-KNAPPE, P; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS letters**, v. 480, n. 2-3, p. 147–50, Sep. 2000.

KURAGANO, T.; SHIMONAKA, Y.; KIDA, A.; FURUTA, M.; NANAMI, M.; OTAKI, Y.; HASUIKE, Y.; NONOGUCHI, H.; NAKANISHI, T. Determinants of hepcidin in patients on maintenance hemodialysis: role of inflammation. **American Journal of Nephrology**, Basel, v. 31, n. 6, p. 534–40, May 2010.

LAI, M. I.; JIANG, J.; SILVER, N.; BEST, S.; MENZEL, S.; MIJOVIC, A.; COLELLA, S.; RAGOISSIS, J.; GARNER, C.; WEISS, M. J.; THEIN, S. L. Alpha-haemoglobin stabilising protein is a quantitative trait gene that modifies the phenotype of beta-thalassaemia. **British Journal of Haematology**, London, v. 133, n. 6, p. 675-82, June 2006.

LATUNDE-DADA, G. O. Iron metabolism: microbes, mouse, and man. **Bioessays**, Hoboken, v. 31, n. 12, p. 1309–17, dez. 2009.

LI, H.; GINZBURG, Y. Z. Crosstalk between iron metabolism and erythroipoiesis. **Advances in Hematology**, New York, v. 2010, id. 605435, p. 1-12, June 2010.

LI, H.; RYBICKI, A. C.; SUZUKA, S. M.; VON BONSDORFF, L.; BREUER, W.; HALL, C. B.; CABANTCHIK, Z. I.; BOUHASSIRA, E. E.; FABRY, M. E.; GINZBURG, Y. Z. Transferrin therapy ameliorates disease in beta-thalassemic mice. *Nature Medicine*, New York, v. 16, n. 2, p. 177–82, Feb. 2010.

LIPSCHITZ, D. A.; COOK, J. D.; FINCH, C. A. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *The New England Journal of Medicine*, Boston, v. 290, n. 22, p. 1213–1216, May 1974.

MALYSZKO, J.; MYSLIWIEC, M. Hepcidin in anemia and inflammation in chronic kidney disease. *Kidney & Blood Pressure Research*, Basel, v. 30, n. 1, p. 15–30, Feb. 2007.

MAST, A. E.; FOSTER, T. M.; PINDER, H. L.; BECZKIEWICZ, C. A.; BELLISSIMO, D. B.; MURPHY, A. T.; KOVACEVIC, S.; WROBLEWSKI, V. J.; WITCHER, D. R. Behavioral, biochemical, and genetic analysis of iron metabolism in high-intensity blood donors. *Transfusion*, Arlington, v. 48, n. 10, p. 2197–204, 2008.

MAST, A. E.; SCHLUMPF, K. S.; WRIGHT, D. J.; JOHNSON, B.; GLYNN, S. A.; BUSCH, M. P.; OLBINA, G.; WESTERMAN, M.; NEMETH, E.; GANZ, T.; NHLBI Retrovirus Epidemiology Donor Study-II (REDS-II). Hepcidin level predicts hemoglobin concentration in individuals undergoing repeated phlebotomy. *Haematologica*, Pavia, v. 98, n. 8, p. 1324–30, Aug. 2013.

MATOS, J. F. et al. Comparison of discriminative indices for iron deficiency anemia and β thalassemia trait in a Brazilian population. *Hematology*, Amsterdam, v. 18, n. 3, p. 169–74, May 2013.

MELO, L. M. S.; SIQUEIRA, F. A. M.; CONTE, A. C. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Rastreamento de hemoglobinas variantes e talassemias com associação de métodos de diagnósticos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, São José do Rio Preto, v. 30, n. 1, p. 12–17, fev. 2008.

MELO-REIS, P. R.; NAOUM, P. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; DIAS-PENNA, K. G. B.; MESQUITA, M. M.; BALESTRA, F. A.; TERNES, Y. M. F.; MASCARENHAS, C. C.; CHEN, L. C. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes no estado de Goiás, Brasil. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, Brasília, v. 42, n. 6, p. 425–430, dez. 2006.

MICHELSON, A. M. Developmental biology. From genetic association to genetic switch. *Science*, Washington, v. 322, n. 5909, p. 1803–1804, Dec. 2008.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 86, n. 6, p. 480-487, June 2008.

MUÑOZ, M.; VILLAR, I.; GARCÍA-ERCE J. A. An update on iron physiology. **World Journal of Gastroenterology**, Beijing, v. 15, n. 37, p. 4617-26, Oct. 2009.

MUSALLAM, K. M.; TAHER, A. T.; DUCA, L.; CESARETTI, C.; HALAWI, R.; CAPPELLINI, M. D. Levels of growth differentiation factor-15 are high and correlate with clinical severity in transfusion-independent patients with β -thalassemia intermedia. **Blood Cells, Molecules & Diseases**, Orlando, v. 47, n. 4, p. 232-4, Dec. 2011.

MUSALLAM, K. M.; RIVELLA, S.; VICHINSKY, E.; RACHMILEWITZ, E. A. Non-transfusion-dependent thalassemias. **Haematologica**, Pavia, v. 98, n. 6, p. 833-44, Jun. 2013.

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

NEMETH, E. Iron regulation and erythropoiesis. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 15, n. 3, p. 169-75, May 2008.

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 26, p. 323-42, Aug. 2006.

NEMETH, E.; GANZ, T. The Role of Hepcidin in Iron Metabolism. **Acta Haematologica**, Basel, v.122, n. 2-3, p. 78-86, Nov. 2009.

ONG, K. H.; TAN, H. L.; TAM, L. P.; HAWKINS, R. C. W.; KUPERAN, P. Accuracy of serum transferrin receptor levels in the diagnosis of iron deficiency among hospital patients in a population with a high prevalence of thalassaemia trait. **International Journal of Laboratory Hematology**, Oxford, v. 30, n. 6, p. 487-93, Dec. 2008.

ORIGA, R.; GALANELLO, R.; GANZ, T.; GIAGU, N.; MACCIONI, L.; FAA, G.; NEMETH, E. Liver iron concentrations and urinary hepcidina in beta-thalassemia. **Haematologica**, Pavia, v. 92, n. 5, p.583-8, May 2007.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 22, n. 2, p. 111-21, ago. 2000.

- PAIVA, A. A.; RONDO, P. H. C.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 34, n. 4, p. 421-426, ago. 2000.
- PARK, C. H.; VALORE, E. V.; WARING, A. J.; GANZ, T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of biological chemistry*, v. 276, n. 11, p. 7806–10, Mar. 2001.
- PARROW, N. L.; GARDENGHI, S.; RIVELLA, S. Prospects for a hepcidin mimic to treat β -thalassemia and hemochromatosis. **Expert Review of Hematology**, London, v. 4, n. 3, p. 233–235, June 2011.
- PASRICHA, S.; MCQUILTEN, Z.; WESTERMAN, M.; KELLER, A.; NEMETH, E.; GANZ, T.; WOOD, E. Serum hepcidin as a diagnostic test of iron deficiency in premenopausal female blood donors. **Haematologica**, Pavia, v. 96, n. 8, p. 1099–1105, Apr. 2011.
- PASRICHA, S.; FRAZER, D. M.; BOWDEN, D. K.; ANDERSON, G. J. Transfusion suppresses erythropoiesis and increases hepcidin in adult patients with β -thalassemia major: a longitudinal study. **Blood**, New York, v. 122, n. 1, p. 124–33, July 2013.
- PEFFER, K.; DEN HEIJER, M.; HOLEWIJN, S.; DE GRAAF, J.; SWINKELS, D. W.; VERBEEK, A. L. M.; ATSMAN, F. The effect of frequent whole blood donation on ferritin, hepcidin, and subclinical atherosclerosis. **Transfusion**, Arlington, v. 53, n. 7, p. 1468–74, 2013.
- PESLOVA, G.; PETRAK, J.; KUZELOVA, K.; HRDY, I.; HALADA, P.; KUCHEL, P. W.; SOE-LIN, S.; PONKA, P.; SUTAK, R.; BECKER, E.; HUANG, M. L.; SURYO RAHMANTO, Y.; RICHARDSON, D. R.; VYORAL, D. Hepcidin, the hormone of iron metabolism, is bound specifically to α -2-macroglobulin in blood. **Blood**, New York, v. 113, n. 24, p. 6225–6236, June 2009.
- PIPERNO, A.; GALIMBERTI, S.; MARIANI, R.; PELUCCHI, S.; RAVASI, G.; LOMBARDI, C.; BILO, G.; REVERA, M.; GIULIANO, A.; FAINI, A.; MAININI, V.; WESTERMAN, M.; GANZ, T.; VALSECCHI, M. G.; MANCIA, G.; PARATI, G.; HIGHCARE investigators. Modulation of hepcidin production during hypoxia-induced erythropoiesis in humans in vivo: data from the HIGHCARE project. **Blood**, New York, v. 117, n. 10, p. 2953–9, Mar. 2011.

RAMALHO, A. S.; SILVA, R. B. P.; TEIXEIRA, R. C.; COMPRI, M. B. Hemoglobin screening: response of a Brazilian community to optional programs. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 15, p. 591–5, Sept. 1999.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; MAITLAND, K.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. Alpha thalassaemia is associated with increased soluble transferrin receptor levels. **British Journal of Haematology**, Oxford, v. 103, n. 2, p. 365–369, Nov. 1998.

RIVELLA, S. The role of ineffective erythropoiesis in non-transfusion-dependent thalassemia. **Blood Reviews**, New York, v. 26, suppl. 1, p. s12–s15, 2012.

RIVELLA, S.; GIARDINA, J. P. Thalassemia Syndromes. In: HOFFMAN, R.; BENZ, E. J. Jr.; SILBERSTEIN, L. E.; HESLOP, H.; WEITZ, J.; ANASTASI, J. **Hematology**: basic principles and practice. 6th Ed. Philadelphia: Elsevier, 2012. cap. 38, p. 505-535.

RUND, D.; RACHMILEWITZ, E. β -Thalassemia. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 353, n. 11, p. 1135-1146, Sept. 2005.

SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C. **The Evolution and Genetics of Latin American Populations**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002. 512 p.

SCHECHTER, A. N. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. **Blood**, New York, v. 112, n. 10, p. 3927-3938, Nov. 2008.

SKIKNE, B. S. Serum transferrin receptor. **American Journal of Hematology**, New York, v. 83, n. 11, p. 872-5, Nov. 2008.

SONATI, M. F.; FARAH, S. B.; RAMALHO, A. S.; COSTA, F. F. High prevalence of alpha-thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, London, v.15, n. 4, p. 309-11, 1991.

SOUZA, A. E.; CARDOSO, G. L.; TAKANASHI, S. Y.; GUERREIRO, J. F. Alpha-thalassemia (3.7 kb deletion) in a population from the Brazilian Amazon region: Santarém, Pará State. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 8, n. 2, p. 477-481, Apr. 2009.

SPEECKAERT, M. M.; SPEECKAERT, R.; DELANGHE, J. R. Biological and clinical aspects of soluble transferrin receptor. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, London, v. 47, n. 5-6, p. 213-28, Dec. 2011.

SPLENDORE, S. Para que existem as regras de nomenclatura genética? **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 27, p. 148-152, jun. 2005.

SUOMINEN, P.; PUNNONEN, K.; RAJAMÄKI, A.; IRJALA, K. Serum transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index identify healthy subjects with subclinical iron deficits. **Blood**, New York, v. 92, n. 8, p. 2934–2939, Oct. 1998.

SZOKE, D.; PANTEGHINI, M. Diagnostic value of transferrin. **Clinica Chimica Acta: international journal of clinical chemistry**, Amsterdam, v. 413, n. 15-16, p. 1184-1189, Aug. 2012.

TANNO, T.; BHANU, N. V.; ONEAL, P. A.; GOH, S. H.; STAKER, P.; LEE, Y. T.; MORONEY, J. W.; REED, C. H.; LUBAN, N. L.; WANG, R. H.; ELING, T. E.; CHILDS, R.; GANZ, T.; LEITMAN, S. F.; FUCHAROEN, S.; MILLER, J. L. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. **Nature Medicine**, New York, v. 13, n. 9, p. 1096-101, Sept. 2007.

TANNO, T.; NOEL, P.; MILLER, J. L. Growth differentiation factor 15 in erythroid health and disease. **Current Opinion in Hematology**, Philadelphia, v. 17, n. 3, p.184–190, May 2010.

TAVARES, C. F. F.; GUIMARÃES, J. S.; Almeida, M. R.; SOUZA, A. M. Hemoglobinopatias em escolares de Ribeirão Preto, São Paulo In: Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2011, São Paulo. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.33, supl. 2 Hematologia, p.52, nov. 2011.

TOLENTINO, K.; FRIEDMAN, J. F. An update on anemia in less developed countries. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Northbrook, v. 77, n. 1, p. 44-51, July 2007.

TUSSING-HUMPHREYS, L.; PUSTACIOGLU, C. ; NEMETH, E.; BRAUNSCHWEIG, C. Rethinking iron regulation and assessment in iron deficiency, anemia of chronic disease, and obesity: introducing hepcidin. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, New York, v. 112, n. 3, p. 391-400, Mar. 2011.

URRECHAGA, E. Red blood cell microcytosis and hypochromia in the differential diagnosis of iron deficiency and beta-thalassaemia trait. **International journal of laboratory hematology**, v. 31, n. 5, p. 528–34, Oct. 2009.

VICHINSKY, E. Complexity of alpha thalassemia: growing health problem with new approaches to screening, diagnosis, and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1202, p. 180-187, Aug. 2010.

_____. Advances in the treatment of alpha-thalassemia. **Blood**, New York, v. 26, suppl. 1, p. S31-4, 2012.

_____. Clinical manifestations of α -thalassemia. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, Woodbury, v. 3, n. 5, p. a011742, May 2013.

VICKERS, A. J. Parametric versus non-parametric statistics in the analysis of randomized trials with non-normally distributed data. **BMC Medical Research Methodology**, London, v. 5, p. 35, Nov. 2005.

WAGNER, S. C.; SILVESTRI, M. C.; BITTAR, C. M.; FRIEDRISCH, J. R.; SILLA, L. M. R. Prevalência de talassemias e hemoglobinas variantes em pacientes com anemia não ferropênica. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 27, n. 1, p. 37-42, mar. 2005.

WAGNER, S. C. et al. Prevalence of common α -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. *Genetics and molecular biology*, v. 33, n. 4, p. 641-5, out. 2010.

WALTERS, G. O.; MILLER, F. M.; WORWOOD, M. Serum ferritin concentration and iron stores in normal subjects. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 26, n. 10, p. 770-772, Oct. 1973.

WANG, W.; KNOVICH, M. A.; COFFMAN, L. G.; TORTI, F. M.; TORTI, S. V. Serum ferritin: Past, present and future. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1800, n. 8, p. 760-769, Aug. 2010.

WEATHERALL, D. J. Phenotype-genotype relationships in monogenic disease: lessons from the thalassemias. **Nature Reviews Genetics**, London, v. 2, n. 4, p. 245-255, Apr. 2001.

_____. **Thalassemias**. Encyclopedia of Life Sciences. John Wiley & Sons, Ltd., p. 1-5, Jan. 2005. doi: 10.1038/npg.els.0005536

_____. Disorders of globin synthesis: The Thalassemias. In: LICHTMAN, M. A. et al. **Williams Hematology**. 7th ed. New York: McGraw-Hill Medical, 2006. cap. 46, p. 633-656.

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

WENNING, M. R. S. C.; KIMURA, E. M.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T.; GERVÁSIO, S.; DE JORGE, S. B.; BORGES, E.; SILVA, N. M.; SONATI, M. F. α -Globin genes: thalassemic and structural alterations in a Brazilian population. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, São Paulo, v. 33, n. 9, p. 1041-1045, Sept. 2000.

WESSLING-RESNICK, M. Iron Homeostasis and the inflammatory response. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 30, p. 18.1-18.18, Apr. 2010.

WILLIAMS, J.; MORETON, K. The Distribution of Iron between the Metal-Binding Sites of Transferrin in Human Serum. **Biochemical Journal**, London, v. 185, n. 2, p. 483-488, Feb. 1980.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Iron Deficiency Anaemia**. Assessment, prevention, and control. A guide for programme managers. Geneva, 2001. 114 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005**. WHO global database on anaemia. Geneva, 2008. 48 p.

ZAGO, M. A. Defeitos hereditários das hemoglobinas. In: ZAGO M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004a. Cap. 29, p. 279-281.

ZAGO, M. A. Talassemias. In: ZAGO M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004b. Cap. 31, p. 309-317.

ZAMARO, P. J. A.; HIDALGO, C. A.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Análise quantitativa e molecular de hemoglobina fetal em indivíduos da população brasileira. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São José do Rio Preto, v. 25, n. 4, p. 223-9, dez. 2003.

APÊNDICES

Apêndice A – Parâmetros de normalidade

HEMOGRAMA	F	M	Referências
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,10 - 5,10	4,52 - 5,90	Willians Hematology, 2006.
Hemoglobina (g/dL)	12,0 - 15,3	13,0 - 17,5	
Hematócrito (L/L)	0,36 – 0,45	0,42 – 0,50	Willians Hematology, 7th ed, 2006.
VCM (fL)	80,0 - 96,1		
HCM (pg)	27,5 - 33,2		
CHCM (g/dL)	33,4 - 35,5		
RDW (%)	10,0 - 14,5		
Morfologia	I		Eritrócitos normocíticos e normocrômicos.
Leucócitos (µL)	4.400 - 11.300		Willians Hematology, 7th ed, 2006.
Neutrófilos	1.800 - 7.700		
Mielócitos	0		
Metamielócitos	0		
Bastonetes	0 - 700		
Segmentados	1.800 - 7.000		
Eosinófilos	1 - 450		
Basófilos	0 - 200		
Linfócitos	1.000 - 4.800		
Monócitos	1 - 800		
Plaquetas (µL)	172.000 – 450.000		

STATUS FÉRRICO	F	M	Referências
Ferro sérico (µg/dL)	60 - 170		* Fabricante sugere para cada estudo definir valores de referência do seu controle.
TIBC (µg/dL)	160 - 400		
Saturação transferrina (%)	20 - 60		
Ferritina (ng/mL)	22 - 148	22 - 365	Suominen et al., 1998.
sTfR (mg/L)	1,15 - 2,75		
sTfR/log Ferritin	0,63 - 1,80		

ERITROPOESE	F	M	Referências
Epo (mU/mL)	0,5 - 13,4		*Definido segundo controles.
GDF15 (pg/mL)	200 - 1150		Tanno et al., 2007.

INFLAMAÇÃO	F	M	Referências
Proteína C reativa (mg/L)	< 3		Fabricante Siemens™

HEPCIDINA	F	M	Referências
Hepcidina (ng/mL)	29 - 254	17 - 286	Ganz et al., 2008.

Apêndice B – Eletroforese de hemoglobina do grupo β^+ -talassemia

Paciente TBT	% HbA	% HbA2	% HbF
8	83,1	5,2	0,4
10	80,4	5,4	5,3
21	83,6	5,6	1,4
22	84,1	5,9	1,5
30	83,0	4,7	0,7
38	84,2	5,3	0,9
40	83,5	5,9	1,4
41	84,5	5,2	1,7
42	83,8	5,7	1,6
57	85,1	6,6	0,8
67	85,4	6,0	1,4
127	82,5	6,1	1,6
128	81,5	5,4	6,0
129	79,4	5,0	7,9
130	85,0	5,3	1,5
133	83,4	5,5	1,4
135	83,8	5,0	1,4
136	83,7	4,7	1,2
142	83,5	5,9	1,3
192	81,5	5,0	0,9

Quantificação das hemoglobinas A, A2 e F pelo sistema automatizado Variant II Bio-Rad®, USA, utilizando o kit *β -talassemia Short Program*, por cromatografia líquida de alta eficiência. TBT, traço β -talassêmico, pacientes com β^+ -talassemia.

Apêndice C – Resultados da avaliação hematológica

Grupo: Controle	<i>paciente 1</i>		<i>paciente 2</i>		<i>paciente 5</i>		<i>paciente 24</i>		<i>paciente 26</i>		<i>paciente 43</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,39		4,17		4,36		4,95		4,27		5,05		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	12,8		12,4		12,7		15,6		13,6		16,4		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,38		0,36		0,38		0,45		0,38		0,48		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	87,0		87,0		88,0		92,0		90,0		95,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	29,0		29,8		29,2		31,4		31,9		32,4		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	33,5		34,3		33,3		34,3		35,5		34,0		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,0		11,4		11,1		11,8		12,1		10,9		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	8.000		5.000		7.700		8.100		9.400		4.500		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	59	4720	55	2750	54	4158	43	3483	62	5828	55	2475	1.800 - 7.700	
Bastonetes	4	320	0	0	2	154	0	0	1	94	0	0	0 - 700	
Segmentados	57	4560	55	2750	52	4004	43	3483	61	5734	55	2475	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	2	160	3	150	3	231	5	405	3	282	1	45	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	<94	0	<45	0 - 200	
Linfócitos	35	2800	34	1700	37	2849	44	3564	27	2538	37	1665	1.000 - 4.800	
Monócitos	4	320	8	400	6	462	8	648	8	752	7	315	1 - 800	
Plaquetas (µL)	300.000		327.000		202.000		173.000		292.000		182.000		172.000 - 450.000	

Grupo: Controle	<i>paciente 47</i>	<i>paciente 50</i>	<i>paciente 52</i>	<i>paciente 60</i>	<i>paciente 61</i>	<i>paciente 63</i>	Valores de referência							
Gênero	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	F	M						
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,94	5,19	4,82	5,14	4,41	4,13	4,10 - 5,10	4,52 - 5,90						
Hemoglobina (g/dL)	15,4	15,4	14,0	15,7	12,8	13,1	12,3 - 15,3	13,0 - 17,5						
Hematócrito (L/L)	0,44	0,45	0,42	0,46	0,37	0,38	0,36 - 0,45	0,42 - 0,50						
VCM (fL)	89,0	87,0	88,0	90,0	85,0	94,0	80,0 - 96,1							
HCM (pg)	31,2	29,6	29,0	30,6	29,0	31,8	27,5 - 33,2							
CHCM (g/dL)	35,0	34,0	33,0	33,8	34,0	33,8	33,4 - 35,5							
RDW (%)	10,5	10,9	10,4	10,7	10,3	11,6	10,0 - 14,5							
Morfologia	I	I	I	I	I	I	I							
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	5.800		6.900		4.500		5.000		5.500		8.000		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	58	3364	70	4830	50	2250	66	3300	69	3795	73	5840	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	1	69	0	0	2	100	3	165	3	240	0 - 700	
Segmentados	58	3364	69	4761	50	2250	64	3200	66	3630	70	5600	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	4	232	2	138	1	45	3	150	1	55	2	160	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	29	1682	22	2112	39	1755	24	1200	23	1265	20	1600	1.000 - 4.800	
Monócitos	9	522	6	414	10	400	7	350	5	275	4	320	1 - 800	
Plaquetas (µL)	259.000		190.000		215.000		199.000		173.000		269.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: Controle	<i>paciente 64</i>		<i>paciente 66</i>		<i>paciente 74</i>		<i>paciente 76</i>		<i>paciente 86</i>		<i>paciente 171</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,99		5,35		5,00		4,88		4,14		5,05		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	15,6		16,0		15,2		15,5		12,9		15,3		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,46		0,48		0,43		0,45		0,37		0,44		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	92,0		91,0		88,0		92,0		89,0		88,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	31,3		29,9		30,5		31,8		31,2		30,4		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	33,6		32,9		34,8		34,6		35,1		34,7		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,3		11,5		10,9		11,4		10,6		10,4		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	5.400		5.600		5.900		5.800		5.900		6.500		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	53	2862	71	3976	62	3658	62	3596	48	2832	50	3250	1.800 - 7.700	
Bastonetes	2	108	1	56	2	118	2	116	3	177	3	195	0 - 700	
Segmentados	61	2754	70	3920	60	3540	60	3480	45	2655	47	3055	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	6	324	4	224	3	177	3	174	6	354	6	390	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	1	59	1	65	0 - 200	
Linfócitos	34	1836	20	1120	29	1711	28	1624	40	2360	34	2210	1.000 - 4.800	
Monócitos	7	378	5	280	6	354	7	406	5	295	9	585	1 - 800	
Plaquetas (µL)	150.000		173.000		183.000		184.000		228.000		240.000		172.000 - 450.000	

Grupo: Controle	<i>paciente 173</i>		<i>paciente 179</i>		<i>paciente 186</i>		<i>paciente 193</i>		<i>paciente 203</i>		<i>paciente 204</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,04		4,27		4,93		5,24		4,61		4,37		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	15,3		13,2		14,5		14,8		13,5		13,9		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,45		0,39		0,44		0,45		0,41		0,41		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	90,0		91,0		89,0		87,0		89,0		95,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	30,4		30,9		29,5		28,2		29,3		31,8		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	33,7		34,0		33,4		32,6		33,8		33,6		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,3		12,4		12,7		11,6		11,3		10,2		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	8.900		7.300		7.400		7.300		6.800		9.200		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	71	6319	70	5110	64	4736	60	4380	56	3808	62	5704	1.800 - 7.700	
Bastonetes	5	445	1	73	2	148	1	73	5	340	2	184	0 - 700	
Segmentados	66	5874	69	5037	62	4588	59	4307	51	3468	60	5520	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	2	178	1	73	2	148	5	365	2	136	2	184	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	19	1691	19	1387	28	2072	30	2190	35	2380	29	2668	1.000 - 4.800	
Monócitos	8	712	10	730	6	444	5	365	7	476	8	736	1 - 800	
Plaquetas (µL)	235.000		199.000		177.000		370.000		245.000		259.000		172.000 - 450.000	

Grupo: Controle	<i>paciente 208</i>		<i>paciente 210</i>		<i>paciente 214</i>		<i>paciente 218</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>F</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		F	M
ERITROGRAMA										
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,35		5,05		5,01		4,78		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	12,3		15,4		14,3		14,4		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,37		0,46		0,44		0,43		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	86,0		91,0		87,0		90,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	28,2		30,4		28,5		30,2		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	33,0		33,6		33,6		33,5		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,7		11,2		10,7		10,8		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA										
Leucócitos (µL)	8.300		8.500		8.400		4.500		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	70	5810	51	4335	57	4788	53	2332	1.800 - 7.700	
Bastonetes	2	166	1	85	3	252	2	88	0 - 700	
Segmentados	68	5644	50	4250	54	4536	51	2244	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	249	5	425	3	252	2	88	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	19	1577	35	2975	32	2688	37	1628	1.000 - 4.800	
Monócitos	8	664	9	765	8	672	8	355	1 - 800	
Plaquetas (µL)	314.000		249.000		205.000		191.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: DSR	<i>paciente 25</i>		<i>paciente 44</i>		<i>paciente 45</i>		<i>paciente 62</i>		<i>paciente 69</i>		<i>paciente 72</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,88		4,59		4,74		4,91		4,28		4,79		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	15,0		15,3		14,4		15,8		13,1		14,2		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,43		0,44		0,42		0,46		0,39		0,42		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	89,0		96,0		90,0		93,0		90,0		88,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	30,8		33,3		30,4		32,1		30,6		29,7		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	34,7		34,6		33,9		34,5		34,0		33,8		33,4 - 35,5	
RDW (%)	10,5		11,7		11,6		11,1		11,4		10,2		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (μL)	6.900		7.000		7.000		6.100		9.900		6.000		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	45	3105	64	4480	68	4828	60	3660	55	5445	63	3780	1.800 - 7.700	
Bastonetes	2	138	1	70	0	0	6	366	2	198	3	180	0 - 700	
Segmentados	45	3105	64	4480	68	4828	54	3294	53	5247	59	3540	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	1	69	4	280	1	71	5	305	8	792	2	120	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	44	3036	24	1680	25	1775	27	1647	33	3267	28	1680	1.000 - 4.800	
Monócitos	8	552	7	490	6	426	8	488	4	396	8	480	1 - 800	
Plaquetas (μL)	181.000		261.000		232.000		185.000		260.000		183.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: DSR	paciente 73		paciente 77		paciente 78		paciente 79		paciente 81		paciente 88		Valores de referência	
Gênero	M		F		M		M		M		M		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,03		4,70		4,99		5,54		4,70		5,14		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	15,0		14,2		15,8		16,8		15,0		16,8		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,44		0,41		0,45		0,48		0,43		0,47		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	88,0		86,0		90,0		87,0		92,0		91,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	30,5		30,2		31,6		30,3		32,0		32,7		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	34,8		35,1		35,0		34,6		34,9		35,8		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,2		11,0		10,8		11,4		11,1		10,6		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	5.100		7.900		11.000		5.700		7.700		7.800		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	61	311	77	6083	64	7040	66	3762	66	5082	60	4680	1.800 - 7.700	
Bastonetes	2	102	3	237	2	220	2	114	3	231	3	234	0 - 700	
Segmentados	59	3009	74	5846	62	6820	64	3648	63	4851	57	4446	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	53	3	237	4	440	2	114	5	385	2	156	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	0	<57	1	77	1	78	0 - 200	
Linfócitos	30	1530	16	1264	25	2750	25	1425	22	1694	28	2184	1.000 - 4.800	
Monócitos	6	306	3	237	7	770	7	399	6	462	6	468	1 - 800	
Plaquetas (µL)	139.000		188.000		166.000		162.000		262.000		190.000		172.000 - 450.000	

Grupo: DSR	<i>paciente 163</i>		<i>paciente 164</i>		<i>paciente 184</i>		<i>paciente 187</i>		<i>paciente 197</i>		<i>paciente 198</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,73		5,56		4,87		4,91		5,12		4,92		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	14,3		15,8		15,8		15,4		15,1		14,3		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,44		0,48		0,47		0,45		0,45		0,43		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	92,0		86,0		97,0		92,0		87,0		87,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	30,2		28,4		32,4		31,3		29,4		29,1		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	32,7		32,8		33,5		34,0		33,8		33,6		33,4 - 35,5	
RDW (%)	10,5		10,4		12,3		12,3		10,5		11,0		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (μL)	4.900		6.000		4.100		8.800		6.200		5.700		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	61	2989	63	3780	65	2665	54	4752	63	3906	53	3021	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	49	4	240	1	41	3	264	1	62	2	114	0 - 700	
Segmentados	60	2940	59	3540	64	2624	51	4488	62	3844	51	2907	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	147	3	180	1	41	4	352	4	248	5	285	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0	0	1	88	1	62	0	0	0 - 200	
Linfócitos	31	1519	25	1500	29	1189	33	2904	30	1860	32	1824	1.000 - 4.800	
Monócitos	5	245	9	540	5	205	8	704	2	124	10	570	1 - 800	
Plaquetas (μL)	246.000		161.000		163.000		178.000		382.000		186.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: DSR	<i>paciente 201</i>		<i>paciente 202</i>		<i>paciente 211</i>		<i>paciente 221</i>		<i>paciente 222</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA												
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,21		4,64		5,35		5,32		4,71		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	15,7		12,9		15,1		15,9		14,9		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,48		0,39		0,47		0,48		0,46		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	92,0		84,0		87,0		90,0		97,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	30,2		27,9		28,2		29,9		31,5		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	32,9		33,2		32,3		33,1		32,5		33,4 - 35,5	
RDW (%)	12,1		10,5		11,3		10,4		11,3		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA												
Leucócitos (μL)	4.700		4.600		8.300		5.900		6.300		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	59	2773	44	2024	59	4897	61	3599	55	3465	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	0	0	0	0	0	0	4	252	0 - 700	
Segmentados	59	2773	44	2024	59	4897	61	3599	51	3213	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	12	564	3	138	3	249	4	236	5	315	1 - 450	
Basófilos	1	47	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	23	1081	47	2162	27	2241	27	1593	32	2016	1.000 - 4.800	
Monócitos	5	235	6	276	11	913	8	472	8	504	1 - 800	
Plaquetas (μL)	174.000		255.000		241.000		215.000		224.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: TAT	<i>paciente 46</i>	<i>paciente 71</i>	<i>paciente 110</i>	<i>paciente 114</i>	<i>paciente 119</i>	<i>paciente 143</i>	Valores de referência						
Gênero	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	F	M					
ERITROGRAMA													
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,43	5,01	5,44	4,82	4,74	5,25	4,10 - 5,10	4,52 - 5,90					
Hemoglobina (g/dL)	14,9	14,1	16,6	13,0	12,9	13,6	12,3 - 15,3	13,0 - 17,5					
Hematócrito (L/L)	0,44	0,42	0,48	0,40	0,38	0,41	0,36 - 0,45	0,42 - 0,50					
VCM (fL)	80,0	84,0	88,0	82,0	80,0	80,0	80,0 - 96,1						
HCM (pg)	27,4	28,1	30,6	27,0	27,1	25,9	27,5 - 33,2						
CHCM (g/dL)	34,2	33,6	34,6	32,9	33,7	32,5	33,4 - 35,5						
RDW (%)	10,9	11,8	10,7	10,6	11,1	12,3	10,0 - 14,5						
Morfologia	I	I	I	I	I	I	I						
LEUCOGRAMA													
Leucócitos (µL)	5.800		9.400		9.900		4.400		6.700		7.000		4.400 - 11.300
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL
Neutrófilos	57	3306	62	5828	68	6732	56	2464	49	3283	54	3920	1.800 - 7.700
Bastonetes	1	58	3	282	0	0	2	88	2	134	4	280	0 - 700
Segmentados	56	3248	59	5546	68	6732	54	2376	47	3149	52	3640	1.800 - 7.000
Eosinófilos	5	290	9	846	1	99	3	132	3	201	4	280	1 - 450
Basófilos	0	0	1	94	0	0	1	44	0	0	1	70	0 - 200
Linfócitos	33	1914	24	2256	27	2673	32	1408	43	2881	31	2170	1.000 - 4.800
Monócitos	5	290	4	376	4	396	8	352	5	335	8	560	1 - 800
Plaquetas (µL)	218.000		332.000		269.000		237.000		267.000		253.000		172.000 - 450.000

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: TAT	paciente 157		paciente 172		paciente 182		paciente 188		paciente 194		paciente 195		Valores de referência	
Gênero	M		M		M		F		M		M		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,44		4,08		4,37		4,31		4,61		4,70		4,10 - 5,10	
Hemoglobina (g/dL)	15,0		11,7		12,6		12,2		14,3		13,7		12,3 - 15,3	
Hematócrito (L/L)	0,47		0,35		0,38		0,36		0,42		0,41		0,36 - 0,45	
VCM (fL)	86,0		85,0		87,0		84,0		91,0		87,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	27,5		28,6		28,9		28,2		31,0		29,1		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	32,1		33,8		33,2		33,5		34,2		33,3		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,1		11,3		12,5		12,8		10,8		10,5		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I		I		I		I		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (μL)	7.000		4.200		10.600		6.300		4.000		8.300		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	72	5040	50	2100	64	6784	39	2457	45	1800	60	4980	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	2	84	3	318	1	63	0	0	0	0	0 - 700	
Segmentados	72	5040	48	2016	61	6466	38	2394	45	1800	60	4980	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	210	2	84	2	212	6	378	6	240	1	83	1 - 450	
Basófilos	0	0	1	42	0	0	1	63	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	20	1400	39	1638	27	2862	48	3024	40	1600	31	2573	1.000 - 4.800	
Monócitos	5	350	8	336	7	742	7	441	9	360	8	664	1 - 800	
Plaquetas (μL)	171.000		189.000		263.000		361.000		185.000		248.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: TAT	<i>paciente 216</i>		<i>paciente 217</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA						
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,16		5,67		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	13,9		15,3		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,43		0,48		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	83,0		84,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	26,9		27,0		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	32,6		32,2		33,4 - 35,5	
RDW (%)	11,1		11,7		10,0 - 14,5	
Morfologia	I		I		I	
LEUCOGRAMA						
Leucócitos (µL)	4.700		11.800		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	63	2961	64	7552	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	47	1	118	0 - 700	
Segmentados	62	2914	63	7434	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	10	470	4	472	1 - 450	
Basófilos	1	47	2	236	0 - 200	
Linfócitos	20	940	23	2714	1.000 - 4.800	
Monócitos	6	282	7	826	1 - 800	
Plaquetas (µL)	260.000		207.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: TBT	paciente 8		paciente 10		paciente 21		paciente 22		paciente 30		paciente 38		Valores de referência	
Gênero	M		M		M		F		M		F		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,43		5,97		6,49		5,74		5,05		5,66		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	11,4		12,7		12,8		12,1		10,7		11,9		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,37		0,40		0,41		0,37		0,33		0,37		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	67,0		67,0		63,0		65,0		65,0		66,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	21,0		21,3		19,8		21,0		21,1		21,0		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	31,1		31,6		31,3		32,1		32,5		32,0		33,4 - 35,5	
RDW (%)	13,5		14,1		13,1		12,0		12,6		12,2		10,0 - 14,5	
Morfologia	II		II		II		II		II		II		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	7.300		5.000		8.800		7.400		7.900		6.800		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	51	3723	45	2250	59	5192	53	3922	76	6004	60	4080	1.800 - 7.700	
Bastonetes	6	438	2	100	5	440	5	370	3	237	4	272	0 - 700	
Segmentados	45	3285	43	2150	54	4752	48	3552	73	5767	56	3808	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	14	1022	4	200	4	352	3	222	3	237	5	340	1 - 450	
Basófilos	1	73	0	0	1	88	1	74	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	25	1825	39	1950	31	2728	35	2590	15	1185	27	1836	1.000 - 4.800	
Monócitos	9	657	12	600	5	440	8	592	6	474	8	544	1 - 800	
Plaquetas (µL)	221.000		204.000		275.000		299.000		265.000		273.000		172.000 - 450.000	

Grupo: TBT	<i>paciente 40</i>		<i>paciente 41</i>		<i>paciente 42</i>		<i>paciente 57</i>		<i>paciente 67</i>		<i>paciente 127</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,92		5,49		5,28		5,31		4,81		5,62		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	10,6		11,0		11,1		10,4		10,4		11,7		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,33		0,35		0,35		0,34		0,32		0,37		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	68,0		63,0		66,0		64,0		67,0		67,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	21,6		20,0		21,1		19,6		21,6		20,7		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	31,7		31,5		31,9		30,7		32,0		31,1		33,4 - 35,5	
RDW (%)	12,3		12,3		12,7		12,6		12,1		13,1		10,0 - 14,5	
Morfologia	II		II		II		II		II		II		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	6.200		7.500		17.800		7.200		7.200		8.300		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	48	2976	64	4800	86	15308	62	4464	63	4536	51	4233	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	2	150	5	890	1	72	0	0	2	166	0 - 700	
Segmentados	48	2976	62	4650	80	14240	61	4392	63	4536	49	4067	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	5	310	4	300	1	178	4	288	1	72	2	166	1 - 450	
Basófilos	1	62	1	75	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	39	2418	22	1650	11	1958	32	2304	32	2304	38	3154	1.000 - 4.800	
Monócitos	7	434	8	600	3	534	2	144	4	288	9	747	1 - 800	
Plaquetas (µL)	331.000		311.000		376.000		326.000		254.000		381.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: TBT	<i>paciente 128</i>		<i>paciente 129</i>		<i>paciente 130</i>		<i>paciente 133</i>		<i>paciente 135</i>		<i>paciente 136</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>F</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	4,82		5,53		6,32		4,92		5,28		6,71		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	10,2		11,7		12,3		9,9		10,1		13,0		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,32		0,38		0,39		0,32		0,33		0,43		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	66,0		68,0		61,0		64,0		63,0		64,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	21,1		21,1		19,4		20,2		19,0		19,4		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	32,0		31,1		31,6		31,4		30,3		30,1		33,4 - 35,5	
RDW (%)	13,5		14,6		13,4		12,5		13,8		12,5		10,0 - 14,5	
Morfologia	II		II		II		II		II		II		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (μL)	9.400		6.700		7.300		6.900		5.300		6.900		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	68	6392	50	3350	72	5256	57	3933	52	2756	62	4278	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	0	0	1	73	0	0	2	106	4	276	0 - 700	
Segmentados	68	6392	50	3350	71	5183	57	3933	50	2650	58	4002	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	2	188	5	335	1	73	3	207	2	106	4	276	1 - 450	
Basófilos	1	94	1	67	1	73	1	69	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	23	2162	36	2412	17	1241	34	2346	36	1908	23	1587	1.000 - 4.800	
Monócitos	6	564	8	536	9	657	5	345	10	530	11	759	1 - 800	
Plaquetas (μL)	406.000		348.000		372.000		326.000		278.000		336.000		172.000 - 450.000	

Grupo: TBT	<i>paciente 142</i>		<i>paciente 192</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>F</i>		F	M
ERITROGRAMA						
Eritrócitos (10 ¹² /L)	5,99		5,11		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	12,6		10,9		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,40		0,34		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	68,0		68,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	21,0		21,3		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	31,1		31,5		33,4 - 35,5	
RDW (%)	12,6		13,1		10,0 - 14,5	
Morfologia	II		II		I	
LEUCOGRAMA						
Leucócitos (μL)	5.100		9.900		4.400 - 11.300	
	%	μL	%	μL	μL	
Neutrófilos	53	2703	58	5742	1.800 - 7.700	
Bastonetes	0	0	0	0	0 - 700	
Segmentados	53	2703	58	5742	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	153	3	297	1 - 450	
Basófilos	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	34	1734	30	2970	1.000 - 4.800	
Monócitos	10	510	9	891	1 - 800	
Plaquetas (μL)	270.000		247.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: BTM	<i>paciente 6</i>		<i>paciente 7</i>		<i>paciente 9</i>		<i>paciente 12</i>		<i>paciente 13</i>		<i>paciente 14</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>M</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>F</i>		<i>M</i>		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	3,83		3,10		3,19		2,63		3,21		4,13		4,10 - 5,10	
Hemoglobina (g/dL)	8,9		9,3		9,0		7,7		8,5		11,0		12,3 - 15,3	
Hematócrito (L/L)	0,30		0,28		0,26		0,22		0,26		0,34		0,36 - 0,45	
VCM (fL)	78,0		90,0		81,0		83,0		80,0		82,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	23,4		30,1		28,2		29,4		26,6		26,5		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	30,1		33,5		34,9		35,6		33,2		32,3		33,4 - 35,5	
RDW (%)	22,9		14,9		14,8		11,9		15,4		18,9		10,0 - 14,5	
Eritroblastos (µL)	26000		14700		0		0		29800		18200		0	
Morfologia	V		IV		III		III		V		V		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	8.700		9.500		5.500		2.200		11.000		4.800		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	39	3393	62	5890	57	3135	63	1386	61	6710	42	2016	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	87	0	0	1	55	1	22	0	0	0	0	0 - 700	
Segmentados	38	3306	62	5890	56	3080	62	1364	61	6710	42	2016	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	13	1131	2	190	3	165	2	44	2	220	1	48	1 - 450	
Basófilos	1	87	0	0	1	55	0	0	1	110	1	48	0 - 200	
Linfócitos	33	2871	28	2660	35	1925	24	528	26	2860	40	1920	1.000 - 4.800	
Monócitos	13	1131	8	760	4	220	11	242	10	1100	16	768	1 - 800	
Plaquetas (µL)	811.000		900.000		299.000		189.000		555.000		307.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: BTM	<i>paciente 15</i>	<i>paciente 16</i>	<i>paciente 17</i>	<i>paciente 18</i>	<i>paciente 19</i>	<i>paciente 20</i>	Valores de referência							
Gênero	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	F	M						
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	3,09	3,64	3,38	2,92	3,37	3,01	4,10 - 5,10	4,52 - 5,90						
Hemoglobina (g/dL)	8,9	10,4	9,5	8,7	9,5	8,5	12,3 - 15,3	13,0 - 17,5						
Hematócrito (L/L)	0,26	0,31	0,28	0,25	0,29	0,24	0,36 - 0,45	0,42 - 0,50						
VCM (fL)	84,0	84,0	82,0	87,0	85,0	81,0	80,0 - 96,1							
HCM (pg)	29,0	28,6	28,0	29,9	28,2	28,2	27,5 - 33,2							
CHCM (g/dL)	34,3	33,9	34,1	34,4	33,2	34,5	33,4 - 35,5							
RDW (%)	13,9	11,8	12,4	13,3	15,2	14,4	10,0 - 14,5							
Eritroblastos (µL)	0	0	0	1300	16000	300	0							
Morfologia	III	III	III	IV	V	IV	I							
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	8.000		5.800		4.800		7.300		9.800		9.600		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	70	5600	66	3828	70	3350	55	4015	68	6664	67	6432	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	80	1	58	1	48	0	0	1	98	2	192	0 - 700	
Segmentados	69	5520	65	3770	69	3312	55	4015	67	6566	65	6240	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	1	80	5	290	1	48	3	219	1	98	1	96	1 - 450	
Basófilos	1	80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0 - 200	
Linfócitos	23	1840	23	1334	18	864	33	2409	27	2646	23	2208	1.000 - 4.800	
Monócitos	5	400	6	348	11	528	8	584	4	392	9	864	1 - 800	
Plaquetas (µL)	391.000		163.000		219.000		283.000		705.000		433.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: BTM	paciente 28		paciente 29		paciente 32		paciente 36		paciente 37		paciente 39		Valores de referência	
Gênero	M		M		M		M		M		M		F	M
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	3,29		3,64		3,13		3,03		3,16		3,04		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	9,8		10,7		9,2		8,9		9,2		9,9		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,29		0,31		0,26		0,25		0,26		0,25		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	89,0		85,0		83,0		84,0		83,0		83,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	29,8		29,3		29,3		29,3		29,0		32,7		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	33,6		34,3		35,1		35,1		34,8		39,2		33,4 - 35,5	
RDW (%)	13,8		12,0		13,6		12,3		11,8		11,7		10,0 - 14,5	
Eritroblastos (µL)	8700		6100		900		0		70		0		0	
Morfologia	IV		IV		IV		III		IV		III		I	
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	21.700		9.800		5.100		6.300		3.700		10.200		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	35	7595	46	4508	52	2652	60	3780	64	2368	76	7752	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	217	1	98	3	153	0	0	0	0	1	102	0 - 700	
Segmentados	34	7378	45	4410	49	2499	60	3780	64	2368	75	7650	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	3	651	3	294	3	153	4	252	1	37	2	204	1 - 450	
Basófilos	1	217	1	98	0	0	0	0	0	0	1	102	0 - 200	
Linfócitos	52	11284	31	3038	36	1836	30	1890	27	999	19	1938	1.000 - 4.800	
Monócitos	9	1953	19	1862	9	459	6	378	8	296	2	204	1 - 800	
Plaquetas (uL)	773.000		720.000		283.000		322.000		250.000		347.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: BTM	<i>paciente 56</i>	<i>paciente 68</i>	<i>paciente 94</i>	<i>paciente 131</i>	<i>paciente 132</i>	<i>paciente 134</i>	Valores de referência							
Gênero	<i>M</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>M</i>	<i>F</i>	<i>F</i>	F	M						
ERITROGRAMA														
Eritrócitos (10 ¹² /L)	3,20	3,40	2,72	2,94	3,26	3,33	4,10 - 5,10	4,52 - 5,90						
Hemoglobina (g/dL)	8,9	9,3	7,9	8,2	9,3	9,2	12,3 - 15,3	13,0 - 17,5						
Hematócrito (L/L)	0,27	0,27	0,22	0,24	0,27	0,28	0,36 - 0,45	0,42 - 0,50						
VCM (fL)	85,0	79,0	83,0	81,0	84,0	84,0	80,0 - 96,1							
HCM (pg)	27,9	27,4	29,3	27,8	28,4	27,7	27,5 - 33,2							
CHCM (g/dL)	32,8	34,7	35,3	34,4	33,7	32,9	33,4 - 35,5							
RDW (%)	12,9	15,0	11,6	15,1	12,7	13,3	10,0 - 14,5							
Eritroblastos (µL)	5800	100	0	600	100	0	0							
Morfologia	V	IV	III	IV	IV	III	I							
LEUCOGRAMA														
Leucócitos (µL)	7.400		7.100		9.300		9.400		6.500		14.300		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	40	2960	74	4968	80	7440	62	5828	61	3965	58	8294	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	74	1	71	1	93	0	0	1	65	0	0	0 - 700	
Segmentados	39	2886	73	5183	79	7347	62	5828	60	3900	58	8294	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	2	148	2	142	3	279	2	188	1	65	7	1001	1 - 450	
Basófilos	2	148	0	0	1	93	1	94	0	0	1	143	0 - 200	
Linfócitos	47	3478	19	1349	13	1209	26	2444	34	2210	29	4147	1.000 - 4.800	
Monócitos	9	666	5	355	3	279	9	846	4	260	5	715	1 - 800	
Plaquetas (µL)	713.000		341.000		241.000		384.000		336.000		254.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Grupo: BTM	<i>paciente 138</i>		<i>paciente 146</i>		<i>paciente 191</i>		Valores de referência	
Gênero	<i>F</i>		<i>M</i>		<i>F</i>		F	M
ERITROGRAMA								
Eritrócitos (10 ¹² /L)	3,18		3,41		3,35		4,10 - 5,10	4,52 - 5,90
Hemoglobina (g/dL)	9,0		9,3		8,8		12,3 - 15,3	13,0 - 17,5
Hematócrito (L/L)	0,28		0,27		0,26		0,36 - 0,45	0,42 - 0,50
VCM (fL)	88,0		81,0		79,0		80,0 - 96,1	
HCM (pg)	28,2		27,3		26,2		27,5 - 33,2	
CHCM (g/dL)	31,9		33,8		33,2		33,4 - 35,5	
RDW (%)	14,3		13,3		18,1		10,0 - 14,5	
Eritroblastos (µL)	40400		100		700		0	
Morfologia	V		IV		IV		I	
LEUCOGRAMA								
Leucócitos (µL)	9.500		7.000		6.600		4.400 - 11.300	
	%	µL	%	µL	%	µL	µL	
Neutrófilos	52	4940	50	3500	59	3894	1.800 - 7.700	
Bastonetes	1	95	3	210	1	66	0 - 700	
Segmentados	51	4845	47	3290	58	3828	1.800 - 7.000	
Eosinófilos	2	190	3	210	1	66	1 - 450	
Basófilos	0	0	2	140	0	0	0 - 200	
Linfócitos	34	3230	34	2380	27	1782	1.000 - 4.800	
Monócitos	12	1140	11	770	13	858	1 - 800	
Plaquetas (µL)	870.000		430.000		464.000		172.000 - 450.000	

I) normocitose e normocromia; II) microcitose e hipocromia, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos, células alvo); III) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve (raros eliptócitos, dacriócitos); IV) anisocitose e hipocromia discretas, poiquilocitose leve a moderada (eliptócitos, dacriócitos, células alvo) e presença de eritroblastos (maioria ortocromáticos); V) anisocitose e hipocromia moderadas, poiquilocitose acentuada (eliptócitos, dacriócitos e células alvo) e presença de eritroblastos (ortocromáticos, policromáticos e raros basofílicos).

Apêndice D – Resultados das avaliações do metabolismo do ferro e da eritropoese

Grupo: Controle

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (µg/dL)	CTLF (µg/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
1	27	F	0,7	113,9	261,8	43,5	56,5	1,51	0,86	45,3	0,80	0,530	250,4	6,3
2	54	F	1,0	127,6	329,6	38,7	89,3	1,52	0,78	92,8	1,04	0,682	819,7	2,9
5	29	F	0,6	156,5	341,7	45,8	81,3	1,15	0,60	39,2	0,48	0,421	408,5	3,3
24	30	M	1,3	88,0	324,4	28,5	114,0	1,43	0,56	88,3	0,77	0,543	261,8	0,5
26	55	M	1,8	98,6	240,0	41,1	95,1	1,37	0,69	81,0	0,85	0,620	557,9	8,8
43	50	M	1,1	135,7	360,8	37,6	103,0	1,26	0,63	81,4	0,79	0,626	621,5	5,2
47	30	M	1,0	107,0	238,8	44,8	259,0	1,33	0,55	111,7	0,43	0,324	237,6	1,6
50	20	M	0,6	69,2	346,9	20,0	94,9	1,84	0,93	57,8	0,61	0,330	800,7	0,5
52	35	M	0,3	97,5	301,0	32,4	381,0	1,97	0,76	127,3	0,33	0,169	355,8	8,18
60	43	M	0,9	64,99	255,0	25,5	84,0	1,38	0,72	52,5	0,62	0,451	221,2	2,42
61	25	F	0,3	65,31	219,6	29,7	85,3	1,42	0,73	52,4	0,61	0,433	315,0	5,15
63	47	F	0,9	124,8	308,4	40,5	70,0	1,57	0,85	43,8	0,63	0,399	619,6	1,65
64	57	M	0,7	83,8	286,2	29,3	292,0	2,18	0,88	131,3	0,45	0,206	487,3	4,17
66	55	M	1,9	86,6	288,8	30,0	123	1,45	0,70	66,6	0,54	0,372	876,3	3,97
74	29	M	0,4	69,4	281,8	24,6	93,6	1,85	0,94	93,7	1,00	0,541	304,7	5,18
76	36	M	0,8	113,1	265,1	42,6	141,0	1,26	0,59	131,6	0,93	0,738	175,1	1,54
86	30	F	1,4	92,3	226,1	40,8	115,0	1,35	0,66	49,1	0,43	0,315	366,7	1,19
171	29	M	0,9	115,9	347,6	33,3	204,0	0,93	0,40	79,5	0,39	0,420	285,5	4,1
173	27	M	1,2	75,2	229,7	32,8	183,0	1,33	0,59	71,2	0,39	0,293	390,8	8,0
179	23	F	0,4	78,5	272,8	28,8	52,2	1,49	0,87	43,9	0,84	0,566	177,2	2,6
186	54	M	1,5	45,9	250,8	18,3	358,0	1,47	0,58	72,4	0,20	0,138	340,5	6,9

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; Ferrit, ferritina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: Controle

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (µg/dL)	CTLF (µg/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
193	45	M	0,3	78,8	241,2	32,7	90,6	1,10	0,56	82,4	0,91	0,830	258,6	5,3
203	57	F	0,7	91,3	252,1	36,2	84,4	2,18	1,13	55,8	0,66	0,303	472,9	9,7
204	23	F	0,5	78,8	121,0	65,1	103,0	1,18	0,59	31,4	0,30	0,258	116,3	2,2
208	34	F	1,6	130,6	243,5	53,6	29,9	1,22	0,82	24,8	0,83	0,681	380,7	4,5
210	38	M	0,6	169,23	256,8	65,9	170,0	1,02	0,46	79,5	0,47	0,459	539,0	13,4
214	41	M	1,0	80,47	227,1	35,4	109,0	0,65	0,32	43,9	0,40	0,624	356,2	3,4
218	40	F	0,3	78,2	315,6	24,8	37,4	1,654	1,05	23,5	0,63	0,381	262,0	3,6

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: Doadores de Sangue Regulares

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (µg/dL)	CTLF (µg/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
25	24	M	0,3	140,6	302,4	46,5	57,0	1,45	0,83	51,3	0,90	0,619	382,4	0,9
44	50	M	1,7	112,2	277,0	40,5	114,0	1,52	0,74	82,0	0,72	0,475	645,1	6,0
45	30	F	1,1	103,6	295,6	35,1	46,9	1,406	0,84	63,7	1,36	0,966	330,1	3,6
62	31	M	0,6	100,25	282,9	35,4	79,0	1,84	0,97	60,8	0,77	0,418	228,5	8,91
69	52	F	0,6	35,3	262,1	13,5	45,1	1,112	0,67	41,6	0,92	0,830	558,1	1,24
72	33	F	0,6	105,1	302,8	34,7	91,8	1,15	0,58	67,1	0,73	0,638	617,6	2,7
73	33	M	0,3	162,8	261,8	62,2	134,0	1,24	0,58	60,7	0,45	0,364	404,4	5,3
77	49	F	0,6	96,6	311,3	31,0	68,4	1,91	1,04	92,6	1,35	0,710	416,8	4,14
78	25	M	0,4	87,1	231,1	37,7	148,0	1,82	0,84	66,7	0,45	0,247	324,0	5,58
79	31	M	0,5	125,6	296,5	42,3	78,0	1,77	0,94	74,0	0,95	0,535	342,5	1,09
81	48	M	1,0	100,7	249,6	40,4	166,0	1,81	0,82	49,8	0,30	0,165	355,3	2,93
88	29	M	1,6	103,3	213,0	48,5	270,0	1,47	0,60	43,0	0,16	0,108	293,7	7,2
163	42	M	0,3	150,2	241,2	62,3	88,6	1,33	0,68	112,0	1,26	0,954	349,6	4,6
164	35	M	1,2	60,5	258,7	23,4	89,5	2,01	1,03	37,5	0,42	0,208	346,8	5,7
184	53	M	0,4	92,8	235,2	39,4	334,0	1,84	0,73	55,9	0,17	0,091	433,5	5,6
187	30	M	3,2	55,6	241,5	23,0	248,0	2,40	1,00	49,8	0,20	0,084	519,9	13,2
197	20	M	0,3	86,5	250,7	34,5	55,6	1,31	0,75	19,8	0,36	0,273	278,5	5,7
198	30	M	0,9	93,3	268,9	34,7	56,2	1,39	0,79	35,2	0,63	0,452	192,5	2,6
201	30	M	0,3	142,5	196,6	72,5	56,9	1,64	0,93	39,4	0,69	0,422	354,3	2,9
202	27	F	0,4	395,3	786,7	50,3	37,8	0,914	0,58	54,6	1,45	1,582	140,6	3,3
211	32	M	1,3	152,18	272,8	55,8	57,5	1,79	1,02	64,9	1,13	0,630	149,9	7,5
221	36	M	0,4	134,2	216,3	62,0	112,0	1,27	0,62	58,1	0,52	0,410	420,8	8,6
222	59	M	2,9	77,2	209,0	36,9	201,0	1,17	0,51	65,1	0,32	0,276	618,4	3,3

CRP significa proteína C reativa; CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: α^+ -talassemia heterozigota

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (μ g/dL)	CTLF (μ g/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
46	29	M	0,5	124,3	313,4	39,7	192,0	1,75	0,76	125,6	0,65	0,375	210,7	4,3
71	27	F	5,7	43,3	217,3	19,9	38,4	1,76	1,11	39,1	1,02	0,578	1036,5	6,4
110	42	M	2,8	95,7	225,6	42,4	371,0	1,59	0,62	124,7	0,34	0,212	792,6	4,2
114	20	F	3,0	111,6	327,1	34,1	11,0	2,41	2,31	32,2	2,93	1,215	762,0	3,9
119	31	F	3,1	90,4	279,8	32,3	53,5	1,85	1,07	44,3	0,83	0,447	244,9	3,8
143	29	M	3,4	102,0	294,1	34,7	39,0	3,29	2,07	16,0	0,41	0,125	428,3	3,7
157	29	M	0,5	136,5	197,6	69,1	186,0	2,82	1,24	37,2	0,20	0,071	243,6	4,4
172	37	M	0,3	119,9	170,4	70,1	124,0	1,35	0,65	56,2	0,45	0,335	434,7	7,4
182	52	F	7,2	135,5	291,4	46,5	173,0	3,06	1,37	56,9	0,33	0,107	2298,8	3,6
188	22	F	0,8	141,3	328,0	43,1	12,9	1,89	1,70	5,0	0,39	0,205	101,0	2,2
194	51	M	7,5	88,7	239,5	37,0	86,6	1,92	0,99	40,3	0,46	0,242	415,3	8,0
195	29	M	5,1	117,2	317,5	36,9	149,0	2,76	1,27	21,7	0,15	0,053	394,1	5,4
216	22	M	0,7	161,0	233,0	69,1	147,0	3,21	1,48	47,3	0,32	0,100	182,3	3,1
217	30	M	0,3	145,3	221,2	65,7	110,0	1,18	0,58	42,4	0,39	0,328	424,1	4,2

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: β^+ -talassemia

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (μ g/dL)	CTLF (μ g/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
8	68	M	0,5	105,2	238,6	44,1	271,0	9,87	4,06	77,2	0,28	0,029	1363,3	14,0
10	57	M	0,8	91,7	259,2	35,4	357,0	5,17	2,03	167,8	0,47	0,091	917,3	11,3
21	57	M	1,7	82,1	285,7	28,7	506,0	9,60	3,55	115,3	0,23	0,024	1308,8	21,3
22	43	F	4,8	110,2	307,8	35,8	46,9	4,02	2,40	55,2	1,18	0,293	374,8	9,8
30	56	M	14,9	52,1	248,6	21,0	284,0	6,37	2,60	282,1	0,99	0,156	4472,4	10,7
38	47	F	0,6	122,1	271,3	45,0	233,0	3,23	1,37	99,7	0,43	0,132	397,5	7,7
40	47	F	0,9	92,3	282,4	32,7	190,0	3,78	1,66	107,5	0,57	0,150	518,0	13,6
41	31	F	8,8	95,5	336,5	28,4	42,1	3,71	2,29	55,7	1,32	0,356	246,9	11,2
42	46	F	6,4	113,7	309,4	36,8	289,0	3,90	1,58	138,2	0,48	0,123	657,3	2,6
57	43	F	2,0	97,2	284,2	34,2	128,0	3,33	1,58	45,0	0,35	0,106	308,6	5,6
67	26	F	0,3	94,6	255,9	37,0	275,0	3,61	1,48	108,1	0,39	0,109	195,2	5,6
127	30	M	3,0	95,4	252,9	37,7	687,0	3,74	1,32	146,1	0,21	0,057	350,5	3,0
128	36	F	18,9	82,4	212,0	38,9	358,0	3,42	1,34	78,6	0,22	0,064	771,7	8,4
129	42	F	3,2	73,1	275,1	26,6	9,2	9,30	9,65	28,0	3,04	0,327	434,0	12,9
130	27	M	0,3	138,5	231,9	59,7	147,0	6,46	2,98	98,5	0,67	0,104	434,9	2,1
133	49	F	3,1	52,5	321,4	16,4	11,6	2,93	2,75	33,0	2,85	0,972	479,3	19,6
135	56	F	2,8	124,0	258,3	48,0	70,4	6,30	3,41	52,8	0,75	0,119	464,6	10,6
136	64	M	1,7	93,5	222,4	42,0	186,0	3,10	1,37	61,0	0,33	0,106	1202,2	8,8
142	36	M	1,0	195,4	232,4	84,1	765,0	4,24	1,47	81,6	0,11	0,025	510,7	6,1
192	35	F	2,9	143,9	306,2	47,0	151,0	2,25	1,03	62,1	0,41	0,183	129,6	6,4

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: β^0 -talassemia

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (μ g/dL)	CTLF (μ g/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
6	19	M	1,8	175,3	263,6	66,5	3014,0	23,21	6,67	40,1	0,013	0,007	6160	72,1
7	30	F	6,8	357,0	393,1	90,8	3273,0	18,87	5,37	76,9	0,023	0,012	7336	96,2
9	22	F	8,1	200,4	294,7	68,0	1214,0	13,91	4,51	29,6	0,024	0,012	14956	119,3
12	25	F	12,6	165,7	266,5	62,2	3303,0	16,17	4,60	52,8	0,016	0,008	19483	139,6
13	23	F	9,9	183,9	266,0	69,1	4935,0	12,97	3,51	86,0	0,017	0,009	7404	79,1
14	39	M	27,9	167,7	271,6	61,7	3257,0	14,79	4,21	55,7	0,017	0,009	7069	100,0
15	33	F	12,0	212,6	306,7	69,3	514,0	9,02	3,33	23,1	0,045	0,022	7060	54,1
16	30	M	0,7	137,5	207,2	66,4	4115,0	3,98	1,10	220,7	0,054	0,027	6892	22,6
17	33	M	0,8	190,5	214,0	89,0	4605,0	9,65	2,63	198,7	0,043	0,022	7211	58,9
18	28	F	6,6	193,8	236,7	81,9	3504,0	14,96	4,22	39,2	0,011	0,006	12914	120,0
19	23	F	2,0	216,1	294,5	73,4	3477,0	22,43	6,33	111,2	0,032	0,016	6573	30,6
20	22	M	0,9	273,2	607,0	45,0	758,0	25,76	8,95	26,7	0,035	0,018	16062	186,2
28	21	M	1,8	255,7	294,6	86,8	1999,0	13,21	4,00	31,2	0,016	0,008	12914	64,4
29	26	M	10,0	251,9	348,0	72,4	3078,0	7,21	2,07	128,7	0,042	0,021	6378	54,9
32	33	M	1,0	395,7	576,3	68,7	3608,0	18,26	5,13	25,4	0,007	0,004	14150	122,0
36	24	M	0,5	259,2	635,6	40,8	3217,0	16,57	4,72	60,7	0,019	0,009	15551	29,8
37	20	M	0,6	241,7	540,6	44,7	3124,0	26,12	7,47	38,2	0,012	0,006	19119	80,9
39	20	M	3,7	257,3	410,0	62,7	833,0	10,75	3,68	42,6	0,051	0,026	10385	170,8
56	18	M	1,3	205,9	274,5	75,0	2554,0	13,90	4,08	145,8	0,057	0,029	14219	121,0
68	22	M	1,1	256,8	309,8	82,9	3474,0	16,40	4,63	49,0	0,014	0,007	17064	74,1
94	27	F	4,2	252,4	419,9	60,1	1344,0	10,15	3,25	102,1	0,076	0,038	5950	54,1

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

Grupo: β^0 -talassemia

Paciente	Idade	Sexo	CRP (mg/L)	Ferro sérico (μ g/dL)	CTLF (μ g/dL)	Tsat (%)	Ferritina (ng/mL)	sTfR (mg/L)	sTfR/ log Ferrita	Hepcidina (ng/mL)	Hep/ Fet	(Hep/ Fet)/sTfR	GDF15 (pg/mL)	Epo (mIU/mL)
131	31	M	1,3	282,7	284,0	98,6	3954,0	9,08	2,52	22,7	0,006	0,003	31090	55,3
132	25	F	0,5	193,1	193,6	97,8	4248,0	3,90	1,07	98,6	0,023	0,012	5429	47,5
134	19	F	0,3	218,8	304,1	72,0	2866,0	5,45	1,58	63,3	0,022	0,011	4163	37,5
138	46	F	3,8	233,3	358,4	65,1	270,0	30,43	12,52	12,1	0,045	0,022	7125	47,4
146	20	M	1,6	151,5	206,5	73,4	2591,0	6,04	1,77	44,3	0,017	0,009	8292	159,8
191	30	F	0,6	289,9	663,3	43,7	600,0	19,14	6,89	12,4	0,021	0,010	27105	130,0

CRP significa proteína C reativa, CTLF, capacidade total de ligação ao ferro; Tsat, saturação de transferrina; sTfR, receptor de transferrina solúvel; Hep, hepcidina; Ft, ferritina; GDF15, fator de crescimento diferencial 15; Epo, Eritropoetina.

ANEXOS

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP-USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Of. CEP/FCFRP n.º. 026/2012
kms

Ribeirão Preto, 21 de março de 2012.

À

Pós-graduanda Jacqueline da Silva Guimarães
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Maria de Souza
FCFRP/USP

Prezada Pós-graduanda,

O Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP aprovou, em sua 99ª Sessão Ordinária, realizada em 17/02/2012, o projeto de pesquisa intitulado “PAPEL DA HEPCIDINA NA PATOGENIA DAS DESORDENS NA SÍNTESE DE HEMOGLOBINA”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo CEP/FCFRP n.º. 241.

Informamos que conforme Carta Circular 003/2011 da CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, e também o pesquisador responsável deverão rubricar todas as páginas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, apondo sua assinatura na última página do referido Termo. Ainda, de acordo com a Resolução 196/96, item IV.2, letra d, “o TCLE deverá ser elaborado em duas vias, sendo uma retida pelo sujeito da pesquisa ou por seu representante legal e uma arquivada pelo pesquisador”.

Em atendimento à Resolução 196/96, lembramos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa e a publicação de seu resultado, para acompanhamento, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe.

Atenciosamente,

PROF^a. DR^a. MARIA REGINA TORQUETI
Coordenadora do CEP/FCFRP

Anexo B – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 08 de março de 2012

Projeto de pesquisa: “Papel da hepcidina na patogenia das desordens na síntese de hemoglobina”.

Pesquisadores responsáveis: Prof^ª Dr^ª Ana Maria de Souza (Orientadora)/ Jacqueline da Silva Guimarães (Pós-graduanda).

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto.

“O CEP do HC e da FMRP-USP concorda com o parecer ético emitido pelo CEP da Instituição Proponente, que cumpre as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Diante disso, o HCFMRP-USP, como instituição co-participante do referido projeto de pesquisa, está ciente de suas co-responsabilidades e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos desta pesquisa, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar”.

Ciente e de acordo:

Dr^ª Marcia Guimarães Villanova
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa - HCFMRP-USP

Prof. Dr. José Alexandre de Souza Crippa
Coordenador da Unidade de Pesquisa
Clínica – UPC - HCFMRP-USP

Anexo C – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Dados de identificação

Título do Projeto: **Papel da hepcidina na patogenia das desordens na síntese de hemoglobina**

Pesquisadora: Jacqueline da Silva Guimarães

Telefones para contato: (16) 3602-4204 ou (16) 8166-2011

E-mail: jacquelinesg@fcrp.usp.br

Endereço: Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Avenida do Café, s/n, Monte Alegre. Bloco M, 2º andar, sala 053A. Ribeirão Preto-SP.

Orientadora da Pesquisa: Prof.^a Dr.^a Ana Maria de Souza

Instituição a que pertence o Pesquisador Responsável: Universidade de São Paulo - FCRP

Médica Responsável: Dr.^a Ana Cristina Silva Pinto, matrícula HC-FMRP 10.904 CRM-SP

Meu nome é Jacqueline da Silva Guimarães, sou farmacêutica e aluna de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Gostaria de convidá-lo(a) para participar da pesquisa que estou realizando sobre a utilização do ferro no nosso organismo, cujo objetivo é avaliar o papel de uma proteína chamada hepcidina e relacioná-la com outros testes que avaliam o ferro e a hemoglobina (proteína que transporta o oxigênio) nas doenças relacionadas à hemoglobina que são transmitidas dos pais para os filhos. Acredita-se que mais de 300 000 crianças nasçam a cada ano com uma das formas graves destas doenças e, que aproximadamente 80% desses nascimentos ocorrem em países de média e baixa renda, por esse motivo é importante estudos que contribuam na compreensão do papel da hepcidina nessas doenças.

Caso você aceite, necessito de uma amostra de sangue de 20 mL (duas colheres de sopa), que será coletada por profissional habilitado para garantir o mínimo desconforto possível, com jejum de no mínimo 8 horas. Não haverá utilização de qualquer tipo de procedimento que traga risco potencial aos participantes. Com essa amostra farei vários exames nas células e no plasma (parte líquida do sangue).

Saliento que a sua participação é voluntária, você tem toda a liberdade de se recusar a participar ou mesmo retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem prejuízo para o atendimento/seguimento serviço de saúde do ambulatório de hemoglobinopatias do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Não haverá recompensa financeira pela sua participação.

Essa pesquisa trará informações importantes para a comunidade e para os indivíduos que participarem desse estudo sobre a função da hepcidina, nas doenças relacionadas à hemoglobina que são transmitidas dos pais para os filhos, seu uso como tratamento ou no desenvolvimento de novos medicamentos. Garanto a você total sigilo, assegurando sua privacidade quanto aos dados envolvidos nesta pesquisa, que a qualquer momento do estudo você poderá receber ou solicitar esclarecimentos adicionais sobre quaisquer aspectos relativos à mesma e que tudo o que for dito só será utilizado para esta pesquisa e você não será identificado(a) em momento algum, sendo seu nome trocado para evitar a identificação. É importante que você esteja ciente da possibilidade de publicação deste trabalho ou apresentação dos resultados em congressos e outros eventos científicos, lembrando que, você não será identificado.

O termo de consentimento está impresso em duas vias, sendo que uma delas ficará com você e a outra com o pesquisador. Qualquer dúvida que você tiver a qualquer momento, antes ou durante a pesquisa deverá ser esclarecida por mim ou se preferir pela médica responsável.

Eu, _____, idade _____,

RG nº _____, declaro ter sido informado e concordo em participar, como voluntário, do projeto de pesquisa acima descrito. Declaro que consenti com a retirada de 10 mL (uma colher de sopa) de sangue para esta pesquisa.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de 2012.

Assinatura do paciente

Assinatura da médica responsável

Pesquisador Responsável

Orientadora da Pesquisa