UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão de hepcidina e produção de IL-6 por monócitos
de indivíduos idosos

Julise Cunha Miranda

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da expressão de hepcidina e produção de IL-6 por monócitos
de indivíduos idosos

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biociências
Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título
de Mestre em Biociências Aplicadas à
Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à
Farmácia.

Orientada: Julise Cunha Miranda
Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Ribeirão Preto
2009

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

Miranda, Julise Cunha

Avaliação da expressão de hepcidina e produção de IL-6 por monócitos de indivíduos idosos. Ribeirão Preto, 2009.

160 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Souza, Ana Maria

1. Anemia 2. Idosos 3. Metabolismo do ferro. 4. Hpcidina. 5. Interleucina-6

FOLHA DE APROVAÇÃO

Julise Cunha Miranda

Avaliação da expressão de hepcidina e produção de IL-6 por monócitos de indivíduos idosos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Biociências Aplicadas à Farmácia

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Maria de Souza

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIAS

Aos meus pais, Arnaldo e Rosilene que estiveram presentes em toda essa caminhada, oferecendo apoio para que todos meus objetivos fossem alcançados, carinho e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela proteção e presença constantes.

À Profa. Dra. Ana Maria de Souza por ter me recebido no Laboratório e pela orientação que tanto contribuiu para meus conhecimentos.

À Profa. Dra. Fabíola Attié de Castro pela colaboração para execução desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Evandro José Cesarino que nos ajudou a recrutar pacientes para a realização da pesquisa.

Aos pacientes que gentilmente aceitaram colaborar com o estudo.

À Secretaria Municipal de Saúde e ao Centro de Educação Física, Esportes e Recreação por autorizarem nosso acesso aos indivíduos participantes da pesquisa e ceder espaço para coleta de amostras.

Às pós-graduandas Iêda Maria Martinêz Paíno, Raquel Tognon e Elainy Patrícia Lino Gasparotto pela considerável ajuda na realização dos experimentos.

À todas das pessoas integrantes do Laboratório de Hematologia Clínica da FCFRP/USP, pós-graduandas Flávia Aparecida Paina e Cristiane Fernandes de Freitas Tavares e funcionárias Zita Maria Gregório e Solange Bocardo pela amizade, apoio e incentivo.

À Capes pela concessão da bolsa de mestrado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP pela autorização do desenvolvimento do estudo e oportunidade de realização do mestrado.

“Mesmo que eu tivesse o dom da profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência; mesmo que eu tivesse toda a fé, a ponto de transportar montanhas, se eu não tiver amor, não sou nada.”

Corintios I (13.2)

MIRANDA, J. C. **Avaliação da expressão de hepcidina e produção de IL-6 por monócitos de indivíduos idosos**. 2009. 160f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

RESUMO

Anemia em idosos está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade desta população. As causas das anemias em idosos podem ser divididas em três grupos: anemia das doenças crônicas (ADC), anemia por deficiência de nutrientes, na qual se inclui a anemia por deficiência de ferro (ADF) e anemias de causas “não-identificadas”. A hepcidina constitui uma importante ligação entre defesa primária, inflamação e metabolismo do ferro. A hepcidina é induzida, principalmente, pela interleucina-6 (IL-6), atua como regulador negativo da absorção de ferro e é mediadora da retenção de ferro por monócitos e macrófagos durante inflamação ou infecção. Estudos recentes têm demonstrado o papel da produção desse hormônio por monócitos na homeostase do ferro, num modelo autócrino e parácrino. O presente trabalho teve por objetivo geral correlacionar os níveis de IL-6 produzidos por monócitos em cultura e a expressão de hepcidina em monócitos de indivíduos com ADC, com inflamação sem anemia, ADF e com anemias “não-identificadas” e, por objetivos específicos, verificar a eficiência de parâmetros hematológicos clássicos em avaliar o *status* férrico de idosos; comparar os níveis de IL-6 produzidos por células monocíticas em cultura, nos diferentes grupos de estudo, e relacioná-los com os parâmetros utilizados para caracterização das anemias; comparar os níveis de expressão de hepcidina em células monocíticas, nos diferentes grupos de estudo, e relacioná-los com o estado inflamatório e com os parâmetros utilizados para caracterização das anemias. Para isso, os pacientes foram avaliados através de parâmetro bioquímicos (glicemia, creatinina sérica, γ -glutamil transferase, proteínas totais e albumina, por método colorimétrico e proteína C-reativa, por imunoturbidimetria ultra-sensível) e hematológicos (hemograma completo, utilizando o contador de células Micros 45 – ABX®, França, e extensão sangüínea corada por Leishman, ferritina sérica, por método imunoquimioluminescente, receptor de transferrina solúvel, por ensaio imunoenzimático e cálculo do índice sTfR/log ferritina). A determinação dos níveis de IL-6 foi feita por imunensaio enzimático quantitativo em sobrenadante de cultura de monócitos e a dos níveis de expressão do RNAm da hepcidina em monócitos pela Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR). Os níveis séricos de ferritina estavam estatisticamente diminuídos na população com ADF, embora sem atingir os valores preconizados para diagnóstico de deficiência de ferro. Os níveis de receptor de transferrina solúvel (sTfR) e o índice sTfR/log ferritina estavam elevados em pacientes com ADF, porém, o índice não aumentou a sensibilidade da medida do receptor para pacientes idosos. Estes resultados obtidos sugerem que valores de normalidade para níveis de ferritina e índice receptor-ferritina devem ser revistos para a população idosa. Houve aumento da concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos no grupo Inflamação quando comparado com o grupo Anemia. Os níveis de IL-6 correlacionaram-se positivamente com os níveis da proteína C-reativa e número de leucócitos da população em estudo, porém, não houve correlação com os níveis de RNAm de hepcidina expressos por monócitos. A expressão de RNAm de hepcidina em monócitos mostrou correlação positiva com os níveis séricos de ferritina, porém, não foi diferente entre os grupos de estudo.

Palavras-chaves: Anemias. Idosos. Metabolismo do ferro. Hepcidina. Interleucina-6.

MIRANDA, J. C. **Evaluation of hepcidin expression and IL-6 production by monocytes in elderly**. 2009. 160f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

ABSTRACT

Anemia in elderly is associated with increased morbidity and mortality in this population. The causes of anemia in elderly can be divided into three groups: anemia of chronic diseases (ACD), anemia of nutrients deficiency, which include iron deficiency anemia (IDA) and “unexplained” anemias. Hepcidin is an important link between primary defense, inflammation and iron metabolism. The hepcidin is mainly induced by the Interleukin-6 (IL-6), it acts as a negative regulator of iron absorption and it is mediating of iron retention by monocytes and macrophages during inflammation or infection. Recent studies have been demonstrating the role of this hormone production by monocytes in the iron homeostasis, in autocrine and paracrine fashion. The general objective of this study was to correlate the levels of monocyte-derived IL-6 in culture and the monocyte hepcidin mRNA expression in patients with ACD, with inflammation without anemia, IDA and with “unexplained” anemias. The specific objectives are to verify the efficiency of classic haematological parameters in evaluating the iron status in elderly; to compare the levels of monocyte-derived IL-6 in culture, in different study groups, and to relate them with the parameters used for anemias characterization; to compare the levels of monocyte hepcidin mRNA expression, in different study groups, and to relate them with the inflammatory state and with the parameters used for anemias characterization. For that, the patients were evaluated by biochemical parameter (blood glucose, serum creatinine, γ -glutamyl transferase, total proteins and albumin, by colorimetric method and high-sensitivity C-reactive protein, measured by immunoturbidimetric assay) and hematological (complete blood count, using the cells accountant Micros 45 – ABX®, and peripheral blood film for Leishman’s staining morphology, serum ferritin level by immuno-quimioluminescent assay, soluble transferrin receptor, by Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) and sTfR/log ferritin index). The determination of IL-6 levels was performed by quantitative ELISA in monocyte culture supernatants and monocyte hepcidin mRNA levels by Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Although serum ferritin levels were statistically decreased in IDA population, it did not reach the values recommended for diagnosis of iron deficiency. The soluble transferrin receptor (sTfR) levels and the sTfR/log ferritin index were significantly higher in IDA group, however, the index did not increase the sensibility of the sTfR measure for elderly. These results suggest that normality values for ferritin levels and sTfR/log ferritin index should be reviewed for elderly population. There was increase of levels of monocyte-derived IL-6 in culture in Inflammation group compared with Anemia group. The IL-6 levels were positively correlated with C-reactive protein levels and leukocyte number of the patients, however, there was not correlation with monocyte hepcidin mRNA levels. The monocyte hepcidin mRNA levels showed positive correlation serum ferritin levels, however, it was not different between the study groups.

Keywords: Anemias. Elderly. Iron metabolism. Hepcidin. Interleukin-6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Principais causas de morte em ambos os sexos, 1998, em países de baixa e média renda, por idade. Fonte: OMS, 2005.....	22
Figura 2.	Endocitose do complexo ferro, transferrina e receptor de transferrina. Adaptado de DE DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2008.....	29
Figura 3.	Regulação celular da exportação de ferro para o plasma pela hepcidina. Adaptado de GANZ, 2007.....	34
Figura 4.	Software do aparelho Mastercycler ep Realplex 4 utilizado para realização dos ensaios de PCR em Tempo Real.....	54
Figura 5.	Exemplo de curva de amplificação de uma amostra de β -actina, destacando o threshold e o Ct ou threshold cycle.....	56
Figura 6.	Exemplo de curva de dissociação da reação de amplificação do gene da β -actina.....	57
Figura 7.	Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase A.....	58
Figura 8.	Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase B.....	59
Figura 9.	Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase C.....	60
Figura 10.	Distribuição dos cinco grupos de estudo. Valores reportados em porcentagem.....	62
Figura 11.	Número de eritrócitos, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	67
Figura 12.	Níveis de hemoglobina, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	68
Figura 13.	Índice hematócrito, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	69
Figura 14.	Volume corpuscular médio (VCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	70
Figura 15.	Hemoglobina Corpuscular média (HCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	71
Figura 16.	Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	71

Figura 17.	Índice RDW dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	72
Figura 18.	Número de leucócitos /mm ³ de sangue dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	73
Figura 19.	Percentual de neutrófilos dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	73
Figura 20.	Percentual de monócitos dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	74
Figura 21.	Número de plaquetas /mm ³ de sangue dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	74
Figura 22.	Níveis séricos de ferritina, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	75
Figura 23.	Níveis de sTfR dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	76
Figura 24.	Valores do índice de sTfR/ log ferritina dos grupos controle ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana....	77
Figura 25.	Níveis da proteína C-reativa dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	78
Figura 26.	Níveis da proteína C-reativa dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	79
Figura 27.	Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e proteína C-reativa.....	79
Figura 28.	Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e o número global de leucócitos.....	80
Figura 29.	Expressão relativa do gene HAMP, reportada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Log10), em monócitos, dos grupos Controle, ADC e ADF. Os dados são reportados como mediana.....	81
Figura 30.	Correlação entre expressão relativa do gene HAMP, reportada como $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Log10), em monócitos, e níveis séricos de ferritina.....	82
Figura 31.	Correlação entre RDW com: (I) contagem de eritrócitos; (II) níveis de hemoglobina; (III) índice hematócrito.....	83
Figura 32.	Correlação entre número de leucócitos totais e níveis de proteína C-reativa.....	84

Figura 33.	Correlação entre CHCM e níveis séricos de ferritina do grupo Controle.....	84
Figura 34.	Correlação entre número de eritrócitos das mulheres do grupo Controle e concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura.....	85
Figura 35.	Correlação entre níveis séricos de ferritina e níveis séricos de proteína C-reativa do grupo ADC.....	86
Figura 36.	Correlação entre índice sTfR/log ferritina e níveis séricos de proteína C-reativa do grupo ADC.....	86
Figura 37.	Correlação entre níveis séricos de ferritina com: (I) níveis séricos de proteína C-reativa e (II) índice hematócrito, em mulheres do grupo ADC.....	87
Figura 38.	Correlação entre RDW e sTfR do grupo Inflamação.....	88
Figura 39.	Correlação entre níveis séricos de ferritina com: (I) número de eritrócitos, (II) níveis de hemoglobina e (III) índice hematócrito do grupo Anemia.....	88
Figura 40.	Correlação entre sTfR e número de eritrócitos do grupo Anemia.....	89
Figura 41.	Correlação entre índice sTfR/log ferritina e número de eritrócitos do grupo Anemia.....	89
Figura 42.	Correlação entre RDW com: (I) hemoglobina e (II) hematócrito do grupo ADF.....	90
Figura 43.	Correlação entre sTfR e número de eritrócitos do grupo ADF.....	91
Figura 44.	Correlação entre índice sTfR/log ferritina com: (I) número de eritrócitos e (II) hematócrito do grupo ADF.....	91
Figura 45.	Sequencia de aminoácidos do precursor da hepcidina. Adaptado de KULAKSIZ et al., 2003.....	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Idade e sexo da população estudada.....	63
Tabela 2 -	Desordens clínicas apresentadas pela população estudada.....	64
Tabela 3 -	Principais medicamentos utilizados pela população estudada.....	65
Tabela 4 -	Parâmetros bioquímicos da população estudada.....	66
Tabela 5 -	Número de eritrócitos em homens dos diferentes grupos de estudo....	67
Tabela 6 -	Níveis de hemoglobina em homens dos diferentes grupos de estudo..	68
Tabela 7 -	Índice hematócrito, em homens, dos diferentes grupos de estudo.....	69
Tabela 8 -	Níveis séricos de ferritina em homens dos diferentes grupos de estudo.....	76
Tabela 9 -	Distribuição dos grupos de estudo na fase C do estudo.....	80
Tabela 10 -	Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e expressão de hepcidina entre os grupos estudados.....	82
Apêndice A -	Medianas dos parâmetros hematológicos, níveis séricos da proteína C-reativa, produção de IL-6 e expressão de hepcidina dos grupos de estudo e diferenças significativas.....	151
Apêndice B -	Correlações entre os diversos parâmetros avaliados na população estudada.....	152

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

aas -	Aminoácidos
AAS -	Ácido Acetil Salicílico
ACD -	Ácido Citrato Dextrose
ADC -	Anemia das Doenças Crônicas
ADF -	Anemia por Deficiência de Ferro
AI -	Anemia da Inflamação
AIDS -	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AINEs -	Antiinflamatórios não esteroidais
BMP -	<i>Bone morphogenetic proteins</i>
CEFER -	Centro de Educação Física, Esportes e Recreação do Campus USP de Ribeirão Preto
CHCM -	Concentração de hemoglobina corpuscular média
COX -	Ciclooxigenase
C_t -	<i>Threshold cycle</i>
CTH -	Células tronco hematopoéticas
DCYTB -	Citocromo b duodenal
DF -	Deficiência de ferro
DMT-1 -	Transportador de metal divalente-1
ECA -	Enzima conversora de angiotensina
EDTA K₂ -	Ácido etilenodiamino tetra-acético de potássio
ELISA -	Ensaio imunoenzimático
EPO -	Eritropoietina
FCFRP -	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FeTf -	Transferrina monoférrica
Fe₂Tf -	Transferrina diférrica
FPN -	Ferroportina
GDFs -	<i>Growth differentiation factors</i>
HAMP -	Hepcidin antimicrobial peptide
HCM -	hemoglobina corpuscular média
HFE -	Produto do gene da hemocromatose
HJV -	Hemojuvelina

HOCl -	Ácido hipocloroso
LPS -	Lipopolissacarídeo
IC -	Insuficiência cardíaca
IL-(1, 1α, 1β, 2, 6, 8, 10) -	Interleucina-(1, 1 α , 1 β , 2, 6, 8 10)
IREs -	Elementos responsivos ao ferro
IRP- (1, 2) -	Proteínas reguladoras de ferro-(1, 2)
NF-$\kappa\beta$ -	Fator nuclear- $\kappa\beta$
NFIL-6 -	Fator nuclear-IL-6
$\bullet$NO -	Óxido nítrico
OMS -	Organização Mundial da Saúde
ONOO- -	Peroxinitrito
PBS -	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase
PDGF -	Fator de crescimento derivado de plaquetas
RDW -	Índice de amplitude de distribuição de eritrócitos
RPMI -	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase - Transcriptase Reversa
sICAM-1 -	Moléculas de adesão intercelular-1
sIL-6 -	Receptor solúvel de IL-6
SMAD -	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 4</i>
SNC -	Sistema Nervoso Central
STAT3 -	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription 3</i>
STEAP3 -	<i>Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3</i>
sTfR -	Receptor de transferrina solúvel
TA -	Temperatura de anelamento
TGF-β -	<i>Transforming growth factor-β</i>
Tf -	Transferrina
TfR-(1,2) -	Transferrina-(1,2)
Tf-TfR -	Complexo receptor transferrina
TLR4 -	<i>Toll-like receptor 4</i>
TNF-(α) -	Fator de necrose tumoral-(α)
VCM -	Volume corpuscular médio
γ-GT -	Gama-Glutamil Transferase

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	iii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Anemia por Deficiência de Ferro e Anemia de Doenças Crônicas.....	22
1.2. Metabolismo do Ferro.....	25
1.2.1. Absorção, liberação, transporte, reciclagem e estocagem do ferro.....	26
1.2.2. Marcadores de deficiência de ferro.....	31
1.3. A Hepcidina.....	31
1.4. Interleucina-6.....	37
1.5. Considerações finais.....	40
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. Geral	42
2.2. Específicos.....	42
3. CASUÍSTICA.....	43
3.1. Exames laboratoriais da fase A.....	46
3.2. Exames laboratoriais da fase B.....	48
3.2.1. Separação de células e Cultura celular.....	49
3.2.2. Determinação de IL-6.....	50

3.3. Exames Laboratoriais da fase C.....	51
3.3.1. Extração de RNA.....	52
3.3.2. Síntese de cDNA por transcrição reversa a partir do RNA.....	53
3.3.3. Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	53
3.4. Análise Estatística.....	57
4. RESULTADOS.....	61
4.1. Características da população estudada.....	62
4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos diferentes grupos de estudo.....	66
4.3. Avaliação do estado do ferro dos diferentes grupos de estudo.....	75
4.4. Avaliação dos níveis de proteína C-reativa dos diferentes grupos de estudo..	77
4.5. Avaliação da produção de IL-6 por monócitos em cultura dos pacientes dos diferentes grupos de estudo.....	78
4.6. Avaliação da expressão de hepcidina por monócitos dos pacientes dos diferentes grupos de estudo.....	80
4.7. Correlações entre os parâmetros avaliados nos diferentes grupos de estudo.	82
5. DISCUSSÃO.....	93
5.1. Características dos grupos de estudo	94
5.1.1. Prevalência de anemia, idade e sexo da população.....	94
5.1.2. Desordens Clínicas.....	97
5.1.3. Medicamentos.....	100
5.1.4. Parâmetros Bioquímicos.....	102
5.2. Parâmetros hematológicos.....	103
5.3. Proteína C-reativa.....	109
5.4. Produção de IL-6 por monócitos em cultura	112
5.5 Avaliação da expressão de hepcidina por monócitos	115
6. CONCLUSÕES.....	123

7. REFEÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
APÊNDICE A - Medianas dos parâmetros hematológicos, níveis séricos da proteína C-reativa, produção de IL-6 e expressão de hepcidina dos grupos de estudo e diferenças significativas.....	151
APÊNDICE B - Correlações entre os diversos parâmetros avaliados na população estudada.....	152
ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	154
ANEXO B - Questionário para avaliação dos pacientes.....	156
ANEXO C - Documento de Aprovação pelo Comitê de Ética.....	157
ANEXO D - Documento de Autorização da Secretaria Municipal da Saúde.	158
ANEXO E - Ofício de autorização para utilização do espaço do CEFER e acesso aos participantes do projeto 3ª idade do CEFER.....	159
ANEXO F - Autorização para utilização do espaço do CEFER e acesso aos participantes do projeto 3ª idade do CEFER.....	160

1.INTRODUÇÃO

Em 1987, o envelhecimento populacional já era descrito como uma realidade brasileira. O grupo etário com 60 anos ou mais era o que mais crescia, proporcionalmente, na população, desde 1940, devido a um progressivo declínio nas taxas de mortalidade e taxas de fecundidade brasileira. Da mesma forma já havia uma preocupação com os problemas decorrentes do envelhecimento (RAMOS; VERA; KALACHE, 1987). A rapidíssima mudança na estrutura etária brasileira cria, para o País, oportunidades para o enfrentamento de alguns problemas básicos, principalmente relacionados às crianças e jovens, porém coloca novos desafios, gerados pelo envelhecimento de sua população (CARVALHO; GARCIA, 2003). Em relação à saúde, essa problemática tendia a ser a mesma que se verificava nos países desenvolvidos, como doenças crônicas que requeriam cuidados continuados e custosos, agravada pelo fato de persistirem problemas como desnutrição e doenças infecciosas (RAMOS; VERA; KALACHE, 1987).

A mudança no perfil demográfico da população brasileira gera uma mudança no seu perfil epidemiológico, com alterações relevantes no quadro de morbimortalidade. As doenças infectocontagiosas que, em 1950, representavam 40% das mortes registradas no país, no ano 2000 eram responsáveis por menos de 10% dessas mortes. O oposto ocorreu com as doenças cardiovasculares que, em 1950, representavam 12% das mortes e, atualmente, mais de 40% do total de mortes. Isso mostra que nesse período o país passou de um perfil de morbimortalidade típico de uma população jovem para um perfil caracterizado por enfermidades crônicas, próprias das faixas etárias mais avançadas, com custos diretos e indiretos elevados (GORDILHO et al., 2000). Conforme os indivíduos envelhecem, as doenças não-transmissíveis transformam-se nas principais causas de morbidade, incapacidade e mortalidade em todas as regiões do mundo, inclusive nos países em desenvolvimento (OMS, 2005), como mostra a Figura 1.

Figura 1. Principais causas de morte em ambos os sexos, 1998, em países de baixa e média renda, por idade.
Fonte: OMS, 2005

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) lançou o documento “Envelhecimento Ativo: Uma Política de Saúde” que descreve essa revolução demográfica mundial. Este documento prevê que em 2025, existirão aproximadamente 1,2 bilhões de pessoas com mais de 60 anos no mundo e que até 2050 haverá dois bilhões, sendo 80% nos países em desenvolvimento. Em 2002, o Brasil ocupava o sexto lugar em número de pessoas acima de 60 anos de idade (14,1 milhões) entre os países com população igual ou superior a 100 milhões. Até 2025, ele ocupará a quinta posição (33,4 milhões), superando a Federação Russa. Neste documento, a OMS amplia o conceito de “Envelhecimento Saudável” e propõe o programa de “Envelhecimento Ativo” com objetivo de aumentar a expectativa de uma vida saudável e a qualidade de vida para todas as pessoas que estão envelhecendo, inclusive as mais frágeis, fisicamente incapacitadas e que requerem cuidados. A palavra “ativo” refere-se à participação contínua nas questões sociais, econômicas, culturais, espirituais e civis, e não somente à capacidade de estar fisicamente ativo ou de fazer parte da força de trabalho (OMS, 2005).

O cuidado de saúde destinado ao idoso é bastante caro, e a pesquisa corretamente orientada pode propiciar os instrumentos adequados para uma maior eficiência na adoção de prioridades e na alocação ótima de recursos, além de subsidiar a implantação de medidas apropriadas à realidade brasileira (GORDILHO et al., 2000). A lei n. 8.842, de 4 de janeiro de 1994, que dispõe sobre a política nacional do idoso tem como diretriz o apoio a estudos e pesquisas sobre as questões relativas ao envelhecimento para detectar o caráter epidemiológico de determinadas doenças do idoso, com vistas a prevenção, tratamento e reabilitação (BRASIL, 1994).

1.1. Anemia por Deficiência de Ferro e Anemia de Doenças Crônicas

Anemia em idosos está relacionada ao aumento da morbidade e mortalidade desta população. É um fator de risco para doenças cardiovasculares e morte precoce, contribui para fadiga e gera impactos negativos na função cognitiva, função física e sua qualidade de vida, sendo considerado um marcador de aumento de vulnerabilidade (GABRILOVE, 2005).

Anemia é definida pela OMS como a condição na qual a concentração de hemoglobina no sangue está abaixo do normal (WHO, 2001) como consequência de uma biossíntese anormal (CARVALHO; BARACAT; SGARBIERI, 2006). A prevalência da anemia entre adultos com idade superior a 70 anos é aproximadamente 2% (RIMON et al., 2002) e pode se elevar até 28% em homens com idade superior a 85 anos (IZAKS; WESTENDORP; KNOOK; 1999).

Os eritrócitos em desenvolvimento requerem ferro, protoporfirina e globina em quantidades ótimas para a produção de hemoglobina. Neste sentido, as anemias caracterizadas pela síntese deficiente de hemoglobina podem ser divididas dependendo de qual dos três compostos está deficiente. No grupo das anemias caracterizadas por distúrbios do metabolismo de ferro, estão a Anemia por Deficiência de Ferro (ADF) e a Anemia das

Doenças Crônicas (ADC) como as mais comuns (CARVALHO; BARACAT; SGARBIERI, 2006).

A ADF é a deficiência nutricional mais comum em todo o mundo (HAAS, BROWNLIE, 2001) e, em nosso país, é a carência nutricional mais prevalente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Nos Estados Unidos, a prevalência de ADF varia de acordo com idade, sexo e raça (KILLIP, BENNETT, CHAMBERS, 2007). Os grupos populacionais mais vulneráveis incluem, em ordem de prioridade, mulheres grávidas e lactentes, crianças de 0-2 anos, pré-escolares de 2-6 anos, mulheres não grávidas em idade fértil, idosos, adolescentes e homens adultos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

Os efeitos adversos e consequências correlacionadas a ADF são: diminuição da produtividade no trabalho (HAAS; BROWNLIE, 2003), decréscimo do desenvolvimento infantil (HALTERMAN et al., 2001), atraso do desenvolvimento cognitivo em crianças e adolescentes, fadiga em mulheres adultas, podendo ainda afetar as funções da visão e audição (ALGARIN et al., 2003; VERDON et al., 2003). Ocorre como resultado de um balanço negativo de ferro por um longo período, culminando com a exaustão dos estoques de ferro do organismo (MARKOVIC; MGKIC-SINGH; SUBOTA, 2005).

O diagnóstico da deficiência de ferro é influenciado por muitas desordens clínicas que alteram o metabolismo do ferro. A característica mais comum na maioria dessas desordens é a inflamação, que prejudica o suprimento de ferro ao plasma (GANZ, 2005).

A maioria dos pacientes que sofrem de infecções crônicas, doenças inflamatórias crônicas e algumas doenças malignas desenvolvem uma anemia moderada designada Anemia das Doenças Crônicas (ADC) ou Anemia da Inflamação (AI) (GANZ, 2005). A ADC é a causa mais freqüente de anemias em pacientes hospitalizados, particularmente em pacientes com idade superior a 65 anos, e a segunda causa mais freqüente de anemia. É também uma das síndromes clínicas mais comuns na prática clínica (CANÇADO; CHIATTONE, 2002).

A ADC é uma consequência comum de infecções crônicas como a AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*), tuberculose, endocardite bacteriana, osteomielite e de distúrbios inflamatórios não infecciosos generalizados como doenças reumatológicas, doença do intestino irritável, mieloma múltiplo e outras doenças malignas (GANZ, 2005; NEMETH et al., 2004). Pacientes com ADC têm baixos níveis de ferro sérico, transferrina normal ou diminuída, concentração de ferritina sérica normal ou aumentada e presença de ferro nos macrófagos da medula óssea, indicando mobilização prejudicada dos estoques de ferro (GANZ, 2005). Apresenta-se, inicialmente, como uma anemia normocítica normocrômica. A produção de eritrócitos é suficientemente alta resultando em uma anemia leve a moderada.

Na maioria das formas de ADC a destruição de eritrócitos está levemente acelerada, e a medula possui reserva eritropoética suficiente para compensar este aumento da destruição eritrocitária. Estudos sugerem que a produção de eritropoetina na ADC é menor que em outros tipos de anemias, por isso a resposta da medula óssea não é satisfatória. Se há restrição de ferro, a ADC pode se tornar microcítica e hipocrômica devido à progressiva depleção dos estoques de ferro. A ADC é indiferente a reposição oral de ferro, contudo, estudos mostraram que pode ser corrigida parcialmente com ferro parenteral (GANZ, 2006a).

Citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-6 (IL-6) e interleucina-1 (IL-1) exercem um papel chave orquestrando três características patognomônicas da ADC. Primeiro, a resposta à eritropoetina (EPO) na anemia é cega devido à inibição da expressão do gene EPO e diminuição da resposta à EPO das células eritróides. Segundo, a homeostase do ferro é desregulada culminando no desvio do tráfego do ferro da medula óssea para os estoques retículo-endoteliais, onde o “bloco retículo-endotelial” suprime a liberação do ferro. Terceiro, a proliferação e diferenciação de células progenitoras eritróides estão prejudicadas (OKONKO et al., 2005).

1.2. Metabolismo do Ferro

O ferro é um componente essencial de hemoglobina e mioglobina e de muitas enzimas envolvidas em reações de redox e metabolismo energético (GANZ, 2006b). É um fator de crescimento essencial para a proliferação e diferenciação de todas as células vivas, sendo envolvido no transporte de oxigênio, pela hemoglobina e mioglobina, no transporte de elétrons durante a respiração mitocondrial, como parte de complexo enzimático I e II e na regulação de transcrição, como componente de ribonucleotídeo redutase ou pela modulação das afinidades de ligação dos fatores de transcrição, como catalisador de processos que envolvem liberação de radicais (WEISS, 2005). Deficiência celular severa de ferro resulta em inibição da proliferação celular e, eventualmente, em morte celular (COOK, 2005).

A produção diária de 200 bilhões de novos eritrócitos requer 20 mg de ferro para síntese de hemoglobina. A importância biológica do ferro é atribuída às suas propriedades químicas como metal de transição nas reações de oxidação-redução entre seus estados ferroso (2^+) e férrico (3^+). Essas mesmas propriedades químicas explicam sua toxicidade na forma livre, pois produz radicais que danificam membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (ANDREWS, 2004; ANDREWS, 2005; HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). O Fe^{2+} reage com H_2O_2 ou lipoperóxidos, na reação de Fenton, gerando radicais altamente reativos, como $OH^\bullet$, $LO^\bullet$ e $LOO^\bullet$, responsáveis por estes danos. (GANZ; NEMETH, 2006).

A homeostase do ferro necessita de um controle rigoroso de entrada, estocagem e liberação, bem como controle da distribuição intracelular (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004) para que cada célula do organismo tenha um suprimento adequado de ferro para suas necessidades metabólicas enquanto mantém concentrações extracelulares na faixa de $10\text{-}30\mu\text{M}$, em humanos (GANZ; NEMETH, 2006).

O ferro é mantido em um sistema fechado não regulado por mecanismos de excreção pelo fígado e rins. As perdas de ferro ocorrem por hemorragias e descamação de mucosas

(ANDREWS, 2005). O organismo conserva ferro, a perda é desprezível, chegando, em um homem normal, a 0,9 mg por dia a partir de células desprendidas do intestino, do trato urinário e da pele. Em condições saudáveis, o ferro é absorvido da dieta em quantidade suficiente para equilibrar a perda diária (0,6 a 2,1mg) e permitir o acúmulo de até 2000mg de ferro durante a vida. Nas mulheres, a maior parte do ferro acumula-se depois que cessa a menstruação (RAPPAPORT, 2000). A limitada habilidade dos humanos de excretar ferro (GREEN, 1968¹ *apud* GANZ; NEMETH, 2006) significa que o balanço total de ferro no organismo é obtido através da regulação da absorção do ferro da dieta (MCLAREN et al., 1991²; SKIKNE; COOK, 1992³ *apud* GANZ; NEMETH, 2006).

1.2.1. Absorção, liberação, transporte, reciclagem e estocagem do ferro

O ferro deve atravessar as membranas apicais e basolaterais das células do epitélio do duodeno e da primeira porção do jejuno para alcançar o plasma. O ferro não pode entrar nas células passivamente sem a ajuda de proteínas carreadoras específicas. Esse transporte requer enzimas que alteram a oxidação do ferro (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

Na superfície apical das células do duodeno existe uma ferriredutase, a citocromo b duodenal (DCYTB), que converte o FeIII a FeII. A DCYTB medeia o transporte de um elétron do NADP do citosol para o FeIII extracelular. O transportador de metal divalente-1 (DMT-1) é um importador de ferro intestinal que transporta FeII e outros metais divalentes por um mecanismo próton-acoplado. O DMT1 é expresso na superfície de absorção dos enterócitos e nos endossomos de todas as células. O ferro do enterócito pode ser incorporado

¹ GREEN, R.; CHARLTON, R.; SEFTEL, H.; BOTHWELL, T.; MAYET, F.; ADAMS, B.; FINCH, C.; LAYRISSE, M.; Body iron excretion in man: a collaborative study, **Am. J. Med.**, v. 45, p. 336–353, 1968.

² MCLAREN, G.D.; NATHANSON, M.H.; JACOBS, A.; TREVETT, D.; THOMSON, W. Regulation of intestinal iron absorption and mucosal iron kinetics in hereditary hemochromatosis, **J. Lab. Clin. Med.**, v.117, p. 390–401, 1991.

³ SKIKNE, B.S.; COOK, J.D. Effect of enhanced erythropoiesis on iron absorption, **J. Lab. Clin. Med.**, v. 120, p. 746–751, 1992.

à ferritina celular e ser perdido por descamação do epitélio, ou ser enviado à circulação através do exportador de ferro, a ferroportina (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

A transferrina (Tf) é uma proteína plasmática abundante que se liga a dois átomos de ferro com alta afinidade. É responsável pela circulação plasmática do ferro, previne a precipitação do íon Fe^{3+} no plasma, evitando que ele reaja com outras moléculas, por atenuar sua atividade redox e direcionar o ferro para células que contém receptor de transferrina. Desta forma, o ferro permanece na forma não reativa, não tóxica, mas ligado fortemente a ela (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

Existem mecanismos transferrina-dependentes que promovem a internalização do complexo ferro-proteína, como o receptor de transferrina-1 (TfR1) expresso em vários tipos celulares, com maior importância nos precursores eritróides que necessitam de maior quantidade de ferro para a síntese de hemoglobina (ANDREWS, 2004; ANDREWS, 2005). Outra proteína homóloga, o receptor de transferrina-2 (TfR2), tem um papel mais especializado neste processo e sua expressão é restrita aos hepatócitos, células da cripta duodenal e células eritróides (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004).

Transferrina diférrica (Fe_2Tf) ou monoférrica (FeTf) liga-se ao receptor formando o complexo Tf-TfR, que é internalizado por endocitose. O pH baixo do endossomo promove a remoção do ferro deste complexo. A acidificação do lúmen endossomal por prótons (H^+) tipo V-ATPase permite a dissociação do Fe^{3+} da transferrina, acelera sua redução à Fe^{2+} e fornece um gradiente de H^+ para energizar o transporte do Fe^{2+} , mediado por DMT1, do endossomo para o citosol (MACKENZIE et al, 2006). O ferro liberado é reduzido para o estado ferroso por uma ferriredutase, a STEAP3 (*Six-transmembrane epithelial antigen of prostate 3*) (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008) e transportado através da membrana do endossomo para o citoplasma, via DMT1 (MACKENZIE; GARRICK, 2005). No citoplasma das células eritróides, o ferro é incorporado à protoporfirina para produção do heme, nas mitocôndrias

(ANDREWS, 2005; DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008). O TfR1-Tf retorna à ligação na membrana da célula na face extracelular, onde o pH neutro e o ferro plasmático livre promovem a liberação da Tf para o plasma e o TfR1 permanece pronto para o próximo ciclo de entrada de ferro na célula (MACKENZIE; GARRICK, 2005). Esse processo é denominado “ciclo da transferrina” (ANDREWS, 2005) (Figura 2).

A entrada de ferro no organismo ocorre também através de uma rota indireta (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). Pouco se sabe sobre a reciclagem de ferro pelos macrófagos apesar de sua importância fisiológica. Macrófagos tissulares reconhecem eritrócitos senis e danificados e os fagocitam removendo-os da circulação. Dentro dos macrófagos os eritrócitos são lisados e a hemoglobina é degradada. Heme oxigenases catalisam a liberação de ferro do grupo heme (ANDREWS, 2004; ANDREWS, 2005; GANZ, 2006b), parte do ferro recuperado é conservado em estoque e a parcela remanescente é exportada para a circulação onde vai se ligar à transferrina. Isto é quantitativamente importante, pois, diariamente, somente 1 a 2 mg de ferro é absorvido pelo intestino, enquanto 25 mg são necessários para eritropoese e outros usos. Aproximadamente todo o *pool* de ferro disponível é derivado da reciclagem por macrófagos (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004; GANZ, 2006b).

Uma vez na célula, o ferro que não é necessário para imediata utilização é estocado na forma de ferritina, uma proteína multimérica altamente conservada. Aproximadamente 4500 átomos de ferro são estocados em sua cavidade (ANDREWS, 2005; HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004), uma concentração que excede muito a solubilidade do íon ferroso (GANZ; NEMETH, 2006). A ferritina tem função de estocagem e detoxificação do ferro, sua degradação leva à formação de hemossiderina, um aglomerado de ferro não homogêneo e possui ainda propriedades enzimáticas na conversão do Fe^{2+} para Fe^{3+} (ANDREWS, 2005; HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004).

A molécula de ferritina é formada pela junção de 24 subunidades de polipeptídeos de dois tipos, H- e L-ferritina. H-ferritina tem atividade ferroxidase que cataliza a formação do produto mineral ferro-oxigênio. A degradação da ferritina e concomitante liberação de ferro ajudam a mobilizar ferro para a utilização celular (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). O ferro ferroso pode entrar e sair da ferritina através de poros ou pode também ser liberado da ferritina durante a degradação lisossomal (GANZ; NEMETH, 2006).

Figura 2. Endocitose do complexo ferro, transferrina e receptor de transferrina. Adaptado de DE DOMENICO, WARD e KAPLAN, 2008.

Enterócitos duodenais, macrófagos, hepatócitos, sinciciotrofoblasto placentário e células do Sistema Nervoso Central (SNC) requerem mecanismos para liberar o ferro e

assegurar sua disponibilidade (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). A exportação celular de ferro se dá pela ação da ferroportina (FPN) com a ajuda da ferroxidase ceruloplasmina, em células não intestinais, e hephaestina, em células intestinais (ANDREWS, 2004). Mutações no gene da ferroportina afetam o transporte de ferro, causando patologias de sobrecarga de ferro intracelular (PIETRANGÊLO, 2006), como ocorre na hemocromatose tipo IV (FALZACAPPA; MUCKENTHALER, 2005), causada por mutação no gene SLC40A1 que codifica a ferroportina (SPELETAS et al., 2008).

O controle celular do balanço do ferro no organismo ocorre pela interação de duas proteínas citoplasmáticas, denominadas proteínas reguladoras de ferro (IRP-1 e IRP-2) e é modulado pelos níveis celulares de ferro. As IRPs estão envolvidas nas regulações pós-transcricionais (CALADO; ALBERTO; FALCÃO, 2005; HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004). Os elementos responsivos ao ferro (IREs) são estruturas presentes na molécula de RNAm reconhecidos pelas IRPs. Quando há um aumento nos níveis de ferro do organismo as IRPs se ligam ao ferro e não às IREs. Quando há uma diminuição dos níveis de ferro no organismo, as interações que ocorrem são entre IRPs e IREs e o resultado dessas interações leva à diminuição dos níveis de ferritina e aumento dos níveis de receptor de transferrina e DMT1. Isso ocorre porque no RNAm da ferritina a IRE se localiza na porção 5' não-codificadora (5'UTR) e a formação do complexo IRP/IRE na região 5'UTR inibe as etapas iniciais da tradução. No RNAm do receptor de transferrina, as IREs se localizam na porção 3'UTR, e após a formação do complexo IRP/IRE na região 3'UTR, ocorre estabilização do RNAm favorecendo a tradução (CALADO; ALBERTO; FALCÃO, 2005).

1.2.2. Marcadores de deficiência de ferro

O receptor de transferrina medeia a entrada do complexo transferrina-ferro na célula (MARKOVIC et al., 2007). A clivagem de um domínio extracelular do receptor de transferrina resulta no receptor de transferrina solúvel (sTfR) (PONKA, 1999). Concentrações elevadas de sTfR é marcador de deficiência tissular de ferro e de aumento da atividade eritropoética da medula. Em contraste com a ferritina, a concentração de sTfR não é afetada pela presença de inflamação. Os níveis de ferritina sérica variam de acordo com a quantidade dos estoques de ferro do organismo, enquanto os de receptor refletem o grau de suprimento de ferro tissular (BRUGNARA, 2003; THOMAS; THOMAS, 2002). A determinação dos sTfR e os índices que relacionam os níveis de receptores de transferrina e de ferritina (sTfR/log ferritina ou índice receptor-ferritina) têm sido apontados como parâmetros promissores para avaliação do *status* férrico (SUOMINEN et al., 2000), pois relacionam o aumento do sTfR e a diminuição da concentração da ferritina na deficiência de ferro (MARKOVIC et al., 2007).

1.3. A Hepcidina

As situações mais importantes que promovem a mobilização de ferro no organismo são: sobrecarga ou deficiência de ferro, eritropoese acelerada, hipóxia e inflamação. A diminuição do ferro sérico (hipoferremia) pode ocorrer na hipóxia e eritropoese acelerada e o aumento de ferro sérico (hiperferremia) pode ocorrer na sobrecarga de ferro e inflamação. Esses estímulos são coordenados e se associam com o aumento ou diminuição da absorção intestinal e retenção ou liberação de ferro pelo mecanismo de reciclagem dos macrófagos. Todos esses eventos são coordenados por um hormônio denominado hepcidina (ANDREWS, 2005; MALYSZKO et al., 2006; NEMETH et al., 2004). A hepcidina é o mediador da comunicação entre as células que consomem ferro, principalmente os precursores eritróides,

os estoques de ferro em hepatócitos e macrófagos tissulares e a absorção do ferro da dieta (FALZACARPPA; MUCKENTHALER, 2005).

A descoberta da hepcidina ocorreu por acaso quando se verificou que a perda de um gene vizinho que codificava o fator de transcrição USF2 (Usf 2^{-/-}), em murinos, resultava em sobrecarga de ferro, similarmente à hemocromatose hereditária humana. Estudos posteriores provaram que o gene responsável por causar essas anormalidades na homeostase do ferro codificava a hepcidina, que havia sido purificada de ultra-filtrado de urina e sangue humano como um peptídeo com atividade antimicrobiana (NICOLAS et al., 2001).

A hepcidina foi identificada como um regulador negativo de absorção do ferro em várias condições associadas com alterações do metabolismo de ferro como inflamação, anemia e hipóxia (RAJA et al., 2005). Há fortes evidências que a desregulação da síntese da hepcidina tem papel importante na patogênese de desordens de sobrecarga de ferro, e na etiologia da Anemia das doenças crônicas (HUGMAN, 2006).

A hepcidina humana é um peptídeo, com 25 aminoácidos, estabilizado por quatro pontes dissulfeto, identificado primeiramente na urina humana e no plasma (LOU et al., 2004; NEMETH et al., 2004). Os hepatócitos são a principal fonte de hepcidina, mas estudos recentes também detectaram síntese de hepcidina, em menores níveis, em neutrófilos ativados por bactérias (GANZ, 2005; GANZ, 2006b; NEMETH et al., 2004), monócitos/macrófagos, rins, átrio direito cardíaco, medula vertebral, além de expressão significativa no baço, alvéolos e macrófagos derivados da medula óssea de murinos (THEURL et al., 2008). Ela circula no plasma e é excretada na urina (PARK et al., 2001).

A hepcidina é codificada pelo gene HAMP (*Hepcidin antimicrobial peptide*), situado no cromossomo 19, que consiste em três éxons e dois íntrons, sendo produzida como pré-hepcidina com uma sequência de sinal característico e um sítio de clivagem que precede o peptídeo hepcidina (LOU et al., 2004). A expressão de RNAm de hepcidina é principalmente

confinada ao fígado (PIETRANGELO; TRAUTWEIN, 2004). Diferentes estudos revelaram que a expressão do gene HAMP é regulada por três fatores principais: níveis de ferro, concentrações de oxigênio e inflamação (ATANASIU; MANOLESCU; STOIAN, 2006; MALYSZKO et al., 2006).

O gene da hepcidina também foi identificado em outros vertebrados incluindo ratos, suínos e várias espécies de peixes. Sua estrutura assemelha-se com muitos peptídeos antimicrobianos (GANZ, 2005; NEMETH et al., 2004; GANZ, 2006b), e mostra uma modesta atividade nesta função, *in vitro* (MALYSZKO et al., 2006). Como muitos outros peptídeos catiônicos, a atividade antimicrobiana é favorecida por sua baixa força iônica (GANZ, 2005). As concentrações típicas de hepcidina urinária variam entre 3-30 nM (10-100 ng/mL) e podem estar, no mínimo, dez vezes mais altas durante infecções. Devido as baixas concentrações de hepcidina em fluidos biológicos, é improvável que sua atividade antimicrobiana seja uma função biológica importante, mas pode ser um resíduo de sua origem evolutiva ou consequência de sua atividade como um hormônio ferro-regulador (GANZ, 2005; GANZ, 2006b). Se os últimos cinco aminoácidos forem truncados ocorre perda da função *in vivo* (NEMETH et al., 2006).

A hepcidina age por um mecanismo de *feedback* negativo. Aumento dos níveis de ferro sérico resultará na produção hepática do hormônio, que interage com ferroportina (FPN) da membrana do enterócito causando internalização do complexo (GANZ, 2005; HUGMAN, 2006; NEMETH et al., 2004). A porção N-terminal da hepcidina parece ser crítica para a interação com a ferroportina (PIETRANGELO, 2006). Como o ferro continua sendo utilizado pelo organismo, a diminuição dos níveis séricos conduzirá a supressão de secreção de hepcidina, resultando em forte expressão de FPN e transferência de ferro através da membrana basolateral do enterócito, restabelecendo seus níveis. A FPN também é expressa em macrófagos e hepatócitos (GANZ, 2005; HUGMAN, 2006; NEMETH et al., 2004) e a

regulação negativa da FPN induzida pela hepcidina pode explicar o armazenamento de ferro em macrófagos e estoques hepáticos, em situações associadas com aumento de hepcidina, como em inflamação ou infecção (HUGMAN, 2006) (Figura 3).

Células T, células NK (*Natural Killer*) e macrófagos ativados pela formação de proteínas de fase aguda ou de radicais livres, influenciam o metabolismo do ferro, por mecanismos transcricionais ou pós-transcricionais, afetando a recaptação celular, o transporte transmembrânico, a recirculação, os estoques bem como a absorção do ferro. Esses imunorreguladores atuam em diferentes níveis, modulando a expressão de genes críticos pelas vias IRE/IRP-dependentes e –independentes. Proteínas de fase aguda como hepcidina e α 1-antitripsina atuam pós-transcrição afetando mecanismos de importação e exportação de ferro celular (WEISS, 2005). A α 1-antitripsina pode atuar diretamente inibindo a expressão da ferroportina (THEURL et al., 2008).

Figura 3. Regulação celular da exportação de ferro para o plasma pela hepcidina. Adaptado de GANZ, 2007.

A hepcidina pode regular também a expressão de outras proteínas transportadoras de ferro. Em ratos deficientes de hepcidina, os níveis de DMT1 dos enterócitos, DCYTB da membrana apical e FPN da membrana basolateral estão bastante aumentados, com consequente aumento da absorção e sobrecarga de ferro (HUGMAN, 2006). Assim, a expressão dos transportadores duodenais de ferro correlaciona-se inversamente com a expressão hepática de hepcidina, ou seja, se o nível de hepcidina cai, a expressão de DMT1, DCYTB e ferroportina1 aumenta e vice-versa (FALZACARPPA; MUCKENTHALER, 2005)

A regulação da hepcidina por citocinas ou por hipóxia foi demonstrada em hepatócitos primários ou em linhagens de hepatócitos. Entretanto, a exposição direta de hepatócitos ao ferro férrico ou a transferrina diférrica não induz a expressão do RNAm da hepcidina, não esclarecendo como o ferro em excesso estimula a produção de hepcidina em hepatócitos, sugerindo que o sensor de ferro para *up*-regulação da hepcidina *in vivo* pode estar localizado em outros tipos celulares, possivelmente em células de Kupffer (FLANAGAN et. al., 2007). Segundo Pietrangelo (2006), proteínas como HFE (produto do gene da hemocromatose), Tfr2 e HJV (hemojuvelina) emergem como candidatas a sensores de ferro.

A produção de hepcidina é estimulada *in vivo* e *in vitro* por lipopolissacarídeo (LPS) ou turpentina, estímulos inflamatórios padrões. Esta estimulação parece ser mediada pela citocina inflamatória interleucina-6 (IL-6) (PIETRANGELO; TRAUTWEIN, 2004). O papel chave exercido por citocinas inflamatórias como IL-1 e, em particular, a IL-6, é universalmente aceito (PIETRANGELO, 2006).

Estudos recentes mostraram que a hepcidina é induzida pela IL-6 através da ativação da STAT3 (*Signal Transducers and Activators of Transcription 3*) e subsequente ligação no promotor de hepcidina e a STAT3 pode ser ativada por outras citocinas e fatores de crescimento (WRIGHTING; ANDREWS, 2006). É controverso se o HFE, implicado na síntese de hepcidina durante sobrecarga de ferro, é requerido para ativação da hepcidina em

resposta a estímulos inflamatórios, em ratos (PIETRANGELO; TRAUTWEIN, 2004). Baixos níveis de expressão de hepcidina foram observados em pacientes e animais com hemocromatose genética sugerindo que os genes envolvidos na patogênese da doença regulam a expressão da hepcidina. Especula-se que a expressão de hepcidina modulada por HFE pode ocorrer através de uma via paralela ou via não-inflamatória, a via BMP/SMAD (*bone morphogenetic proteins /mothers against decapentaplegic homolog 4*) (WRIGHTING; ANDREWS, 2006). A via inflamatória (IL-6/STAT-3) mostrou ser independente de Tfr2 e HFE, enquanto a via não-inflamatória envolve a hemojuvelina, um provável co-receptor para BMP. A estimulação por BMP também é independente da HFE e Tfr2. Possivelmente outras vias não inflamatórias envolvem HFE, Tfr2 e ferro. A observação que HFE e Tfr2 são associados *in vitro* sugere que algumas ou todas essas vias possuam algum grau de sobreposição (TRUKSA et al., 2007).

Além da formação de hepcidina, a IL-6 estimula a transcrição/tradução da ferritina, a recaptação do complexo haptoglobina-hemoglobina por macrófagos e estimula CD163 (WEISS, 2005).

De Caestecker (2004) identificou membros da superfamília TGF- β (*transforming growth factor- β*) como reguladores da expressão de hepcidina, dentre esses membros estão as BMPs (*bone morphogenetic proteins*), GDFs (*growth differentiation factors*) e outras proteínas. A expansão eritróide pode influenciar a regulação da expressão de hepcidina por meio da liberação de membros da superfamília TGF- β que são secretados pelos eritroblastos durante a eritropoese (TANNO et al., 2007). Nas anemias resultantes de eritropoese ineficiente e/ou hemólise, há hipóxia tissular com consequente expansão da eritropoese e aumento dos níveis de GDF15, que pode inibir a expressão de hepcidina hepática. Com isso há aumento da absorção de ferro da dieta que, posteriormente, pode gerar uma hemocromatose secundária no indivíduo (DE CAESTECKER, 2004)

A indução de hipoferremia e o desvio do tráfego do ferro que ocorre nas condições inflamatórias também têm alguns efeitos positivos. Primeiro, a retirada do ferro da circulação e seu estoque no sistema retículo endotelial reduz a disponibilidade deste nutriente essencial para microrganismos e células tumorais, tornando-se uma estratégia de defesa eficaz para o controle do crescimento de patógenos (WEISS, 2005). As células dos mamíferos se dividem com frequência menor do que as células dos microrganismos e, portanto, os mamíferos possuem esta vantagem adicional em relação à vulnerabilidade apresentada pelos microrganismos. Os mamíferos sequestram o ferro para se ligar às proteínas como ferritina, lactoferrina, siderocalina, em locais menos acessíveis a maioria dos microrganismos invasores como macrófagos e hepatócitos (JURADO, 1997⁴ *apud* GANZ; NEMETH, 2006). Segundo, o desenvolvimento da anemia limita a disponibilidade de transporte de oxigênio, e os tecidos proliferativos (tumores) são mais afetados, pois o oxigênio é essencial para o metabolismo energético, e consequentemente para a proliferação e a diferenciação de células. Terceiro, reduzindo a quantidade circulante de metabólitos ativos de ferro, a resposta imune se direciona contra patógenos invasores e células tumorais, estimulando a resposta imune efetora mediada por células e afetando a diferenciação de subtipos de linfócitos (WEISS, 2005).

1.4. Interleucina-6

As citocinas são proteínas pequenas solúveis produzidas por uma célula, que alteram o comportamento ou as propriedades de outra célula, normalmente, em resposta a um estímulo, induzindo respostas por meio de ligação a receptores específicos (JANEWAY et al., 2002; OPPENHEIM; RUSCETTI, 2000). Constituem um grupo diversificado de proteínas de sinalização intracelular, que ativam transcricionalmente genes-alvo não específicos, e participam na regulação de processos biológicos como crescimento, motilidade, diferenciação

⁴ JURADO, R.L. Iron, infections, and anemia of inflammation, **Clin. Infect. Dis.**, v. 25, p. 888–895, 1997.

ou função de suas células alvo, nas respostas inflamatórias e imunológicas locais e sistêmicas, na cicatrização de feridas e na hematopoese, dentre outros.

Em contraste aos hormônios endócrinos, as citocinas não são produzidas por glândulas especializadas, mas por uma variedade de tecidos e células individuais (PARSLOW; BAINTON, 2000) e podem atuar de maneira endócrina, afetando o comportamento de células distantes, embora isto dependa de sua capacidade de circulação e de sua meia-vida (JANEWAY et al., 2002). As citocinas podem ser secretadas individualmente ou como parte de uma resposta coordenada, em conjunto com outras citocinas não relacionadas. Muitas são funcionalmente redundantes, isto é, há uma extensa sobreposição de suas atividades. Além disso, uma citocina pode induzir a secreção de outras citocinas ou mediadores, produzindo uma cascata de efeitos biológicos (PARSLOW; BAINTON, 2000).

A IL-6 é uma citocina com múltiplas atividades biológicas em uma variedade de células (PARSLOW; BAINTON, 2000). Seu pleiotropismo natural é refletido nos vários nomes dados a esta citocina, como fator estimulador de célula B-2, fator de crescimento de plasmacitoma, fator estimulador de hepatócito, interferon- β 2. Consiste de uma glicoproteína de 212 aminoácidos (RYFFEL et al., 1992) com peso molecular que varia entre 22.000 e 30.000 Da, codificada por um gene localizado no cromossomo humano 7. Pode ser produzida por muitos tipos celulares, incluindo linfócitos T e B ativados, monócitos, células endoteliais, células epiteliais e fibroblastos. Sua expressão é induzida vários estímulos, incluindo TNF, IL-1, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e agentes que ativam linfócitos T e B e macrófagos (PARSLOW; BAINTON, 2000; RYFFEL et al., 1992) e suas concentrações seguem um ritmo circadiano (MAGGIO et al., 2006).

A IL-6, juntamente com o TNF- α e IL-1, faz parte de um grupo de citocinas conhecidas como pirógenos endógenos, pois derivam de uma fonte endógena e não de componentes bacterianos e causam elevação da temperatura corporal. Um dos seus efeitos

mais bem conhecidos é o início da reação conhecida como reação de fase aguda que envolve alteração em proteínas secretadas pelo fígado, no plasma sanguíneo, resultantes da atividade de IL-1, IL-6 e TNF- α sobre os hepatócitos (JANEWAY et al., 2002).

Na resposta de fase aguda, os níveis de algumas proteínas plasmáticas caem, ao passo que os de outras aumentam marcadamente. As proteínas cujas sínteses são induzidas por IL-6, TNF- α e IL-1 são chamadas de proteínas de fase aguda. Uma dessas proteínas, a proteína C-reativa, é um membro da família protéica das pentraxinas, assim denominadas porque são formadas por cinco subunidades idênticas (JANEWAY et al., 2002). A proteína C-reativa humana se liga a um subgrupo de carboidratos encontrados em diferentes tipos de bactérias e fungos capazes de opsonizá-la e ativar a cascata do complemento (PARSLOW; BAINTON, 2000).

O LPS é um produto exclusivo da superfície bacteriana, que serve de alvo apropriado para reconhecimento imunológico. Os complexos formados por proteínas e LPS são facilmente reconhecidos por receptores presentes em células endoteliais, neutrófilos, monócitos e outros tipos celulares humanos. A ligação dos complexos de LPS a receptores da superfície celular transmite sinais que podem resultar em alterações fisiológicas nas células do hospedeiro. Por exemplo, a ligação do LPS induz a secreção de várias citocinas por numerosos tipos celulares (PARSLOW; BAINTON, 2000).

A IL-6 é também conhecida como uma “citocina para gerontologistas”, devido ao seu papel nas vias de sinalização implicadas no envelhecimento e morbidade crônica (MAGGIO et al., 2006). Uma hipótese muito comum na literatura é que o processo de envelhecimento está associado com um estado pró-inflamatório crônico (FRANCESCHI et al., 1995). Particularmente, tem se observado um progressivo aumento de citocinas com a idade, com destaque ao aumento da IL-6, que pode alcançar níveis dez vezes maiores em indivíduos centenários (SANSONI et al., 2008).

1.5. Considerações finais

Tem sido demonstrado o papel da hepcidina, produzida em pequenas quantidades por monócitos/macrófagos e por outros tecidos, na homeostase do ferro. O RNAm de hepcidina está aumentado em monócitos de pacientes com ADC e sua relação com a inflamação é suportada por uma forte correlação com os níveis de IL-6. O RNAm da hepcidina contido em monócitos é aproximadamente mil vezes menor que o contido em hepatócitos. Desta forma, enquanto a hepcidina derivada do fígado parece ser o regulador principal da homeostase do ferro na circulação, é proposto que a formação de hepcidina por monócitos e macrófagos ativados resulta em um significativo acúmulo do peptídeo no ambiente inflamatório, o que pode afetar a homeostase do ferro de monócitos e macrófagos, em um modelo autócrino e parácrino. Isto pode ter importância específica em sítios inflamatórios com pobre perfusão como o interstício, onde a hepcidina circulante não é suficientemente abundante e também pode contribuir para o desenvolvimento da retenção do ferro observado na ADC (THEURL et al., 2008).

Se a indução da hepcidina causa hipoferremia, é lógico pensar que a inibição da sua expressão causaria melhoras na anemia da inflamação por aumentar a absorção intestinal de ferro. Assim é possível pensar em uma aplicação terapêutica. Muitos estudos ainda necessitam ser feitos com esse propósito, pois como discutido anteriormente, a hepcidina mostrou ação no combate a infecções *in vitro* (GANZ, 2005; PIETRANGELO; TRAUTWEIN, 2004) e a diminuição do ferro sérico pode estar associada na defesa contra patógenos e células tumorais (EKIZ et al., 2005). Avanços farmacológicos e estudos cuidadosos poderão, no futuro, definir indicações apropriadas para o uso de antagonistas da hepcidina no tratamento da ADC (ANDREWS, 2004; ESTELLA, 2006; MEANS, 2004).

2. OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram:

2.1. Geral

Correlacionar os níveis de IL-6 produzidos por monócitos em cultura e a expressão de hepcidina em monócitos de indivíduos com anemia das doenças crônicas, com inflamação sem presença de anemia, com anemia por deficiência de ferro e com anemia de causa desconhecida.

2.2. Específicos

- a. Avaliar, utilizando parâmetros clínicos, hematológicos e bioquímicos, indivíduos idosos, buscando a identificação de indivíduos com anemia das doenças crônicas, com inflamação sem presença de anemia, com anemia por deficiência de ferro e com anemia de causa desconhecida;
- b. Verificar a eficiência dos parâmetros hematológicos clássicos para avaliação do *status* férrico de indivíduos idosos;
- c. Comparar os níveis de IL-6 produzidos por células monocíticas em cultura dos indivíduos dos diferentes grupos de estudo;
- d. Relacionar os níveis de IL-6 produzidos por células monocíticas em cultura com os demais parâmetros avaliados para identificação e caracterização das anemias;
- e. Comparar os níveis de expressão de hepcidina em células monocíticas dos indivíduos dos diferentes grupos de estudo;
- f. Relacionar a expressão de hepcidina por monócitos com o estado inflamatório dos indivíduos do estudo;
- g. Relacionar a expressão de hepcidina por monócitos com os demais parâmetros utilizados para caracterização das anemias.

3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido com a colaboração de: Prof. Dr. Evandro José Cesarino, cardiologista, Professoras Dras. Fabíola Attié Castro e Cleni Mara Marzocchi Machado, Dra. Iêda Maria Martinez Paino e Zita Maria de Oliveira Gregório, técnica do Laboratório de Hematologia Clínica, todos membros do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

Foram colhidas amostras de 83 indivíduos que concordaram em participar da pesquisa. Deste grupo inicial, 23 indivíduos foram excluídos por não atenderem as condições da pesquisa e 13 não retornaram para coleta da fase B dos estudos, desistindo da participação no projeto.

O grupo de estudo foi composto de 47 indivíduos idosos, sendo 37 mulheres e 10 homens, com idade superior a 60 anos; 43 são pacientes do Ambulatório de Cardio-Geriatria da Rede Pública de Saúde do município de Ribeirão Preto – SP e 04 são integrantes do Centro de Educação Física, Esportes e Recreação (CEFER) do Campus USP de Ribeirão Preto. O acesso aos indivíduos do CEFER se deu mediante autorização (ANEXOS E e F). A participação na pesquisa foi voluntária. Esses pacientes manifestaram concordância com a pesquisa após esclarecimento, assinando o termo de consentimento (ANEXO A). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Of. CEP 24/2006) (ANEXO C) e pela Secretaria Municipal de Saúde de Ribeirão Preto (ANEXO D). Os indivíduos foram selecionados com base na história clínica contida em seus prontuários na Rede Ambulatorial e consultados sob acompanhamento do médico responsável pelo projeto Prof. Dr. Evandro José Cesarino. Dados gerais foram obtidos por questionários preenchidos no momento da coleta do material biológico (ANEXO B).

A coleta do material biológico foi realizada em uma sala da enfermaria do Ambulatório de Cardio-Geriatria da Rede Pública de Saúde, do município de Ribeirão Preto – SP e nas dependências do Centro de Educação Física, Esportes e Recreação (CEFER), sendo providenciadas as condições necessárias para constituição de um ambiente adequado para a coleta de sangue. A coleta esteve sob responsabilidade de profissionais universitários com reconhecida prática, para que a punção venosa fosse menos traumática possível e trouxesse o mínimo de desconforto aos pacientes.

A presente pesquisa contou com três fases experimentais, a saber: (A) exames de triagem, para constituição dos cinco grupos de pesquisa; (B) análise dos níveis de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e (C) determinação da expressão do RNAm da hepcidina em monócitos.

Os cinco grupos de estudo foram assim constituídos:

(1) Grupo Controle: composto por 13 indivíduos, sendo 6 mulheres e 7 homens, que atendiam as seguintes condições: níveis de hemoglobina maiores que 13,0 g/dL, para homens, e maiores que 12 g/dL para mulheres (WHO, 2001), com níveis de proteína C-reativa inferior a 3 mg/L, não portadores de desordens clínicas que alteram o metabolismo de ferro, como doenças inflamatórias e infecciosas agudas e crônicas de qualquer etiologia, e de hemoglobinopatias.

(2) Grupo ADC: composto por 12 indivíduos com anemia das doenças crônicas, sendo 10 mulheres e 02 homens, que atendiam as seguintes condições: níveis de hemoglobina menores que 13,0 g/dL, para homens, e menores que 12 g/dL para mulheres, não portadores de hemoglobinopatias, com desordens inflamatórias e com níveis de proteína C-reativa superior a 3 mg/L.

(3) Grupo Inflamação: composto por 07 indivíduos com inflamação sem presença de anemia, sendo 6 mulheres e 01 homem, que atendiam as seguintes condições: níveis de

hemoglobina maiores que 13,0 g/dL para homens, e maiores que 12 g/dl para mulheres, não portadores de hemoglobinopatias, portadores de doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas e com níveis de proteína C-reativa superior a 3 mg/L.

(4) Grupo Anemia: composto por 07 mulheres anêmicas com proteína C-reativa e *status* férrico normal, que atendiam as seguintes condições: níveis de hemoglobina menores que 12 g/dL, não portadores de hemoglobinopatias e desordens inflamatórias, infecciosas e neoplásicas, constituindo um grupo de anemia cuja etiologia é desconhecida.

(5) Grupo ADF: composto por 10 mulheres portadoras de anemia por deficiência de ferro, que atendiam as seguintes condições: níveis de hemoglobina menores que 12 g/dL, não portadores de hemoglobinopatias e desordens inflamatórias, infecciosas e neoplásicas, com níveis de proteína C-reativa inferior a 3 mg/L, níveis de ferritina sérica menores que 50ng/mL (JOOSTEN, 2004; MARKOVIC, MAJKIC-SINGH, SUBOTA, 2005) e/ou níveis de sTfR acima de 28nmol/L (SUOMINEM et al., 1998).

Pacientes submetidos a cirurgias recentes ou que receberam terapia suplementar de ferro ou transfusão de sangue até três meses antes da coleta das amostras de sangue ou com patologias como diabetes *mellitus* descompensada, câncer, doenças renais ou hepáticas e hemoglobinopatias foram excluídos. Pacientes que apresentaram, na extensão sanguínea corada com Leishman, alterações na morfologia eritrocitária indicativas de hemólise, como eritrócitos policromatófilos, macrócitos, poiquilocitose marcada ou presença de eritroblastos, não foram incluídos nos grupos de estudo.

3.1. Exames laboratoriais da fase A

Para os exames laboratoriais da fase A do experimento foram coletados, por punção das veias da fossa cubital, dez mL de sangue, distribuídos em dois tubos, sendo 03 mL no tubo contendo 30 µL do anticoagulante etileno diamino tetracetato de potássio (EDTA K₂),

para avaliação hematológica, e 07 mL em outro tubo limpo, isento de metais, sem anticoagulante, destinado à obtenção de soro, para realização dos ensaios bioquímicos. A coleta foi realizada no período da manhã, com os pacientes em jejum de 12 horas, e o material foi imediatamente transportado, em recipiente apropriado, para o Laboratório de Hematologia Clínica da FCFRP-USP. As determinações hematológicas foram realizadas no mesmo dia da coleta e o soro foi separado e armazenado em flaconetes a -80° C.

Na fase A, foram realizadas as seguintes avaliações:

(a) Hemograma completo: contagem global de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, concentração de hemoglobina, índice hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de amplitude de distribuição de eritrócitos (RDW), utilizando o contador de células Micros 45 – ABX®, França, e extensão sangüínea corada por Leishman para contagem diferencial de leucócitos e análise da morfologia eritrocitária.

(b) Ferritina sérica, por método imunoquimioluminescente, utilizando o *kit* Ferritin Immulite® - DPC, England, e o aparelho. Immulite 1® - DPC, England.

(c) Receptor de transferrina solúvel, por ensaio imunoenzimático (ELISA), utilizando kit Quantikine soluble transferrin receptor, R&D® Systems, Minneapolis, EUA e aparelho leitor de microplacas de ELISA READER 210, acoplado a lavadora de placas WASHER 200, modelo Microwell System Organon Teknika, Áustria.

(d) Cálculo do Índice transferrina/log ferritina, sendo que o valor de sTfR foi transformado para de nmol/L para mg/L.

(e) Proteína C-reativa, por imunoturbidimetria ultra-sensível, utilizando kit diagnóstico PCR Turbidimétrico, Biotécnica® Indústria e Comércio Ltda, Varginha, Brasil e o aparelho de espectrofotometria Beckman Du® Series 70, USA.

(f) Glicemia, por método colorimétrico, utilizando kit diagnóstico Glicose HC Liquiform, Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil e o espectrofotômetro UV Mini 1240, Shimadzu[®].

(g) Creatinina sérica, por método colorimétrico, utilizando kit diagnóstico Creatinina, Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil e o espectrofotômetro UV Mini 1240, Shimadzu[®].

(h) γ -Glutamyl Transferase (γ -GT), por método cinético, utilizando kit Gama GT Liquiform, Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil e o espectrofotômetro UV Mini 1240, Shimadzu[®].

(i) Proteínas totais e albumina, por método colorimétrico, utilizando, respectivamente, os kits Proteínas Totais e Albumina, Labtest[®], Lagoa Santa, Brasil, e o espectrofotômetro UV Mini 1240, Shimadzu[®].

(j) Eletroforese de hemoglobina em acetato de celulose, utilizando tampão Tris-EDTA-Borato pH 8,6 e quantificação de hemoglobina A₂ por densitometria (NAOUM, 1999), para exclusão dos portadores de hemoglobinopatias.

Parâmetros como hemograma completo, ferritina sérica, receptor de transferrina solúvel, índice sTfR/log ferritina e proteína C-reativa foram as ferramentas utilizadas para identificar e caracterizar as anemias. Parâmetros como glicemia, creatinina sérica, γ -glutamyl transferase (γ -GT), proteínas totais e albumina e eletroforese de hemoglobina foram essenciais para exclusão de pessoas com distúrbios renais, hepáticos, hemoglobinopatias e portadores de diabetes *mellitus*.

3.2. Exames laboratoriais da fase B

Na fase B, os exames hemograma completo, ferritina sérica, receptor de transferrina solúvel, índice transferrina-ferritina e proteína C-reativa foram repetidos para acompanhar a evolução clínica dos pacientes estudados.

Os níveis de IL-6 foram determinados, por ensaio imunoenzimático, em sobrenadante de cultura de células monocíticas isoladas por gradiente de densidade.

Para determinação dos níveis de IL-6 foram coletados 12 mL de sangue venoso distribuídos em dois tubos, sendo 07 mL no tubo contendo 70 µL do anticoagulante etileno diamino tetracetato de potássio (EDTA K₂), para avaliação hematológica, e 02 mL em outro tubo limpo, isento de metais, sem anticoagulante, destinado à obtenção de soro, para realização dos ensaios bioquímicos. O soro foi utilizado para determinação dos níveis de ferritina, receptor de transferrina solúvel e proteína C-reativa. Um mL do sangue com EDTA K₂ foi utilizado para o hemograma completo e os 6 mL restantes foram submetidos à separação das células mononucleares.

3.2.1. Separação de células e Cultura celular

As células mononucleares e polimorfonucleares foram isoladas por gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque de duas densidades diferentes (Histopaque-1077 e Histopaque-1119; Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, USA). As células polimorfonucleares foram utilizadas em experimentos de outro projeto de pesquisa do grupo.

Em um tubo falcon estéril de 15 mL, colocou-se 3 mL de Histopaque-1119, 3 mL de Histopaque-1077, pré- aquecidos a 18–26°C, e 6 mL do sangue venoso anticoagulado com EDTA K₂. O tubo falcon foi centrifugado a 700 g, por 30 minutos, à 22° C. Formaram-se duas camadas opacas distintas A (superior) e B (inferior) após centrifugação. Aspirou-se e eliminou o fluido até 0,5 cm da camada A e transferiu as células mononucleares desta camada para um tubo falcon estéril 15 mL. Aspirou-se e eliminou o fluido restante até 0,5 cm da camada B e transferiu as células polimorfonucleares desta camada para um tubo falcon estéril 15 mL. As células mononucleares foram lavadas com solução PBS (do inglês, *Phosphate Buffered Saline*), contendo 10% de ACD (Ácido Citrato Dextrose), duas vezes, a 240 g, e por 10 min, a 4° C e ressuspensas com 1 mL meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) incompleto (sem soro bovino fetal). As células foram contadas em câmara de Neubauer, na

diluição 1:20, em reagente Vermelho Neutro 0,5% (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA). A viabilidade das células foi verificada, em câmara de Neubauer, diluindo-as 1:20 em solução azul de tripan (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA) 0,2% em PBS (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, USA).

Um total de 1.10^5 monócitos foi incubado em 400 μ L de meio de cultura RPMI 1640 incompleto (sem soro bovino fetal) para adesão dos monócitos à placa de cultura. Após a retirada do sobrenadante, que continha os linfócitos, foi verificada a viabilidade das células aderidas com solução de azul de tripan 0,2%, que foram novamente incubadas com RPMI 1640 contendo soro bovino fetal, com e sem estímulo de LPS 1 μ g/mL. O meio de cultura RPMI 1640 contém L-glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado com penicilina G/estreptomicina, mercaptoetanol e soro humano AB⁺ (*LifeScience Technologies[®], Grand Island, N Y, USA*) e foi previamente inativado por incubação à 56°C, durante 1 hora. Os sobrenadantes das culturas, para a dosagem da interleucina-6, foram obtidos após 12 horas de cultura em estufa com 5% de CO₂, a 37°C. A viabilidade das células cultivadas foi novamente determinada com solução de azul de tripan 0,2% antes da coleta do sobrenadante. Os sobrenadantes foram coletados, aliquotados em flaconetes e armazenados a - 80°C para a realização do ensaio imunoenzimático (ELISA).

Todo processo acima descrito foi realizado em capela de fluxo laminar com material estéril e todos os reagentes utilizados foram autoclavados ou filtrados em membrana filtrante Millipore (Millex HV 0,45 μ m, 25 mm diâmetro) para evitar contaminação da cultura.

3.2.2. Determinação de IL-6

Os níveis de IL-6 no sobrenadante das culturas foram determinados utilizando o kit diagnóstico Human IL-6 Immunoassay (R & D Systems, Minneapolis, EUA) e o aparelho leitor de microplacas de ELISA, READER 210, acoplado a lavador de placas, WASHER 200

(Organon Teknika). A concentração mínima detectável pela técnica empregada é 0,70 pg/mL. A amostra de sobrenadante da cultura foi diluída 1:800 em RPMI 1640 para que os valores de absorbância se adequassem aos valores da curva de calibração.

A determinação foi realizada empregando imunoensaio enzimático quantitativo tipo sanduíche. Foram utilizadas microplacas de poliestireno de 96 poços revestidos com anticorpo monoclonal de rato contra IL-6 humana, padrão IL-6 humana recombinante em uma base de proteína tamponada, anticorpo policlonal contra IL-6 conjugado ao *horseradish* peroxidase, dois reagentes de cor, solução substrato (A) peróxido de hidrogênio estabilizado e solução do cromógeno estabilizado (B), tetrametilbenzidina, solução *stop* de ácido sulfúrico 2 N, além de tampões e soluções diluentes para as amostras.

As amostras e os padrões foram pipetados nos poços da microplaca; toda IL-6 presente ligou-se ao anticorpo imobilizado. Na lavagem das placas, substâncias não ligadas foram retiradas. O anticorpo policlonal conjugado à enzima foi adicionado aos poços. Fez-se nova lavagem para remover reagente anticorpo-enzima não ligado. Uma mistura de substrato e cromógeno foi adicionada aos poços e a coloração desenvolvida foi proporcional à quantidade de IL-6 ligada. O desenvolvimento de cor foi bloqueado e a intensidade da cor medida no aparelho leitor de microplacas.

3.3. Exames Laboratoriais da fase C

Na fase C da pesquisa, avaliou-se a expressão do gene da hepcidina (gene HAMP) pelas células monocíticas, determinada pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) – Transcriptase Reversa em Tempo Real. Participaram desta fase 19 indivíduos sendo 05 indivíduos dos grupos Controle (3 mulheres e 2 homens), 09 indivíduos do grupo ADC (8 mulheres e 1 homem) e 07 indivíduos do grupo ADF (todas do sexo feminino). Duas pacientes eram portadoras de ADC e ADF concomitante, participando, portanto da análise

estatística de ambos os grupos. Foi realizado, novamente, o hemograma completo dos pacientes.

As células mononucleares foram separadas por gradiente de densidade usando Ficoll-Hypaque-1077 (Sigma Diagnostics, Inc., Missouri, USA) e as células monocíticas separadas por adesão a placa, conforme descrito na fase B. A eficiência da separação celular foi analisada por citometria de fluxo, utilizando o Citômetro de Fluxo FACSCanto BD Biosciences, San Jose, California, EUA e marcação das células em suspensão com anticorpos anti-CD45-FITC (isotiocianato de fluoresceína), anti-CD14-PE (fícoeritrina) e isotipo-gama. Um total de 5×10^6 a 1×10^7 células foram congeladas em 1mL de Trizol (Invitrogen®, Life Technologies Carlsbad, EUA) a -80°C . O material congelado em trizol foi utilizado nos ensaios de expressão gênica.

3.3.1. Extração de RNA

Para a extração do RNA total, as células dos pacientes foram lisadas com 1 mL de trizol (guanidina-isotiocianato-fenol-clorofórmio) e 10 μL de glicogênio 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (Roche®, Indianapolis), conforme descrito por Chomzynski e Sacchi (1987). Durante a lise da amostra, o trizol mantém a integridade do RNA enquanto rompe as células e dissolve os componentes celulares. O RNA foi recuperado da fase aquosa pela adição de clorofórmio (Merck®, Darmstadt, Alemanha) seguida de centrifugação a 12.000 g, por 15 minutos, a 4°C . Nesta etapa separa-se a fase aquosa, que contém o RNA, a fase orgânica, que contém as proteínas, e uma fase contendo maior parte do DNA. A fase aquosa contendo o RNA foi submetida à precipitação com isopropanol gelado (Merck, Darmstadt, Alemanha), incubada *overnight* a -20°C e então, centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4°C . O *pellet* de RNA foi lavado com etanol 70%, ressuspenso em 13 μL de água livre de RNases e DNases (LGCBio®, Cotia, São Paulo). Este material foi armazenado a -80°C até o momento da quantificação.

O RNA foi diluído 1:250 para quantificação por espectrometria, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. O grau de pureza das amostras foi verificado pelo cálculo da razão entre 260 e 280 nm, sendo considerada uma extração de boa qualidade aquela em que a razão obtida ficou entre 1,8 a 2,0. Para o cálculo da concentração da amostra considerou-se que densidade óptica igual a 1 corresponde a 40 µg de RNA/mL, no comprimento de onda de 260 nm. Todas as amostras de RNA foram diluídas para que a concentração final fosse de 1,0 µg/µL. O RNA extraído foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1%, na presença de brometo de etídeo, para determinação de sua qualidade e integridade.

3.3.2. Síntese de cDNA por transcrição reversa a partir do RNA

Para obtenção do cDNA, 1 µL (1 µg) de RNA foi incubado com os reagentes do *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems®, PCR Master Mix, UK), a transcriptase reversa e os deoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP). A mistura foi incubada no equipamento Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha) para a polimerização das novas fitas de cDNA, a 25°C, por 10 minutos e, em sequência, por 2 horas a 37°C. O cDNA sintetizado foi estocado a -20° C para utilização no ensaio de PCR em Tempo Real destinado a quantificação da expressão relativa do gene HAMP. A eficiência da síntese de cDNA foi verificada pela realização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para o gene endógeno (*housekeeping* gene) β-actina.

3.3.3. Quantificação da expressão gênica por PCR em Tempo Real

Os cDNA dos pacientes foram utilizados nos ensaios de PCR em Tempo Real para quantificação da expressão do gene HAMP. Os experimentos de PCR foram realizados no aparelho da Mastercycler ep Realplex 4 (Eppendorf®, Foster City, USA) do Laboratório de

Um oligonucleotídeo (Invitrogen®, Life Technologies Carlsbad, EUA) específico foi desenhado para amplificação e quantificação do gene. A sequência do oligonucleotídeo utilizado na amplificação dos cDNA foi:

Forward:	5'- TGG CTC TGT TTT CCC ACA AC - 3'
Reverse:	5'- GCA GCA GAA AAT GCA GAT GG - 3'

O tamanho do fragmento amplificado pelo oligonucleotídeo foi de 142 pb, a temperatura de anelamento (TA) foi 58,5 °C e o ciclo utilizado foi 95.0°C - 10min / 50 x 95°C - 15seg; 58,5°C - 1min.

A curva padrão foi obtida através da utilização de quatro pontos de diluição do cDNA utilizado como calibrador da reação (1:1, 1:10, 1:100 e 1:1000).

Os resultados obtidos foram representados pelo $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e as análises visaram à comparação dos resultados da expressão dos genes obtidos nas células dos indivíduos controles e pacientes com ADC e ADF. Os valores de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ foram calculados pelas fórmulas:

$\Delta C_t = \text{média do } C_t \text{ do gene alvo da amostra} - \text{média do } C_t \text{ do gene endógeno da amostra}$ $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ do gene alvo da amostra} - \text{média do } \Delta C_t \text{ do gene alvo de todos os controles}$

Assim é possível determinar o $2^{-\Delta\Delta C_t}$ de cada amostra e o valor representa a expressão diferencial do gene investigado nas amostras dos pacientes com ADC e ADF em relação aos controles.

O C_t ou *threshold cycle* é o ciclo em que a fluorescência da amostra excede o *threshold* escolhido (Figura 5). O *threshold* é o limiar de detecção estabelecido pelo usuário para analisar os resultados ao final de uma corrida de PCR em Tempo Real. Os valores de C_t obtidos para as amostras revelam indiretamente a quantidade de RNAm presente nas amostras dos indivíduos.

Figura 5. Exemplo de curva de amplificação de uma amostra de β -actina, destacando o threshold e o Ct ou threshold cycle.

A curva de dissociação fornecida pelo equipamento permite determinar a especificidade do oligonucleotídeo para amplificação do gene de interesse. Neste sentido, a presença de pico único indica especificidade, ou seja, presença apenas de um produto amplificado. A curva de dissociação consiste na monitorização da fluorescência das amostras em relação ao aumento de temperatura, pois à medida que as pontes de hidrogênio, que mantém as duplas fitas do cDNA unidas se rompem, o SybrGreen é liberado na reação. Assim, a observação de um único pico de fluorescência em uma dada temperatura de *melting* significa que houve amplificação de um único produto específico, como pode ser observado no exemplo ilustrado na Figura 6, para curva de dissociação da reação de amplificação do gene da β -actina.

Figura 6. Exemplo de curva de dissociação da reação de amplificação do gene da β -actina.

3.4. Análise Estatística

Os dados obtidos nas fases A, B e C da pesquisa foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns de comparação múltipla e correlação de Spearman para dados não paramétricos, utilizando o Programa GraphPad, *Software Incorporated*, Prism, versão 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

As Figuras 7, 8 e 9 resumizam, respectivamente, os experimentos realizados nas fases A, B e C da pesquisa.

Figura 7. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase A

Figura 8. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase B

Figura 9. Fluxograma dos procedimentos laboratoriais realizados na fase C

4. RESULTADOS

4.1. Características da população estudada

Dentre os 47 indivíduos que participaram da pesquisa, 57,4% eram anêmicos, considerando os valores de hemoglobina menores que 12g/dL, para mulheres e menores que 13g/dL para homens, preconizada pela OMS (GABRILOVE, 2005). Em duas pacientes do estudo, foi diagnosticada presença de ADF e ADC concomitante e, estas pacientes participaram da análise estatística dos dois grupos citados.

A Figura 10 reporta dados, em porcentagem, da distribuição dos cinco grupos de estudo. A Tabela 1 mostra dados referentes à idade e sexo dos pacientes. Não houve diferença estatística significativa entre as médias de idade dos diferentes grupos de estudo quando $p < 0,05$.

Figura 10. Distribuição dos cinco grupos de estudo. Valores reportados em porcentagem.

Tabela 1 - Idade e sexo da população estudada

Grupos de estudo	Idade*	Sexo (n)	
		Feminino	Masculino
Grupo controle (n =13)	69,0 $\pm$ 7,1	6	7
Grupo ADC (n = 12)	71,2 $\pm$ 4,6	10	2
Grupo inflamação (n = 7)	71,7 $\pm$ 3,9	6	1
Grupo anemia (n = 7)	70,7 $\pm$ 5,5	7	0
Grupo ADF (n = 10)	71,3 $\pm$ 5,4	10	0

* Média das idades $\pm$ Desvio padrão

Nas Tabelas 2 e 3 estão sumarizadas, respectivamente, as desordens clínicas e os principais medicamentos utilizados pelos indivíduos dos diferentes grupos de estudo. Os dados destas tabelas foram obtidos por consulta aos prontuários disponíveis no ambulatório, por questionários aplicados aos pacientes e por informações fornecidas pelo clínico. Outras informações obtidas no questionário realizado, como prática de atividade física também são reportadas.

Os parâmetros bioquímicos creatinina, γ -GT, glicemia e proteínas totais e albumina foram essenciais para exclusão de pessoas com distúrbios renais, hepáticos, hemoglobinopatias e portadores de diabetes *mellitus*. Os resultados dos parâmetros bioquímicos para os diferentes grupos estão listados na Tabela 4. Não houve diferença significativa entre os grupos quando $p > 0,05$. Como os valores de referência para γ -GT são diferentes para homens e mulheres, estes dados foram reportados separadamente.

Tabela 2 - Desordens clínicas apresentadas pela população estudada

Doenças e condições associadas	Grupo controle (n=13)		Grupo ADC (n = 12)		Grupo inflamação (n =7)		Grupo anemia (n = 7)		Grupo ADF (n = 10)	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Artrose /Artrite / Reumatismo / Neurite ciática (n=24 / 49,0%)	3	23,1	9	75,0*	6	85,7*	2	28,6	4	40,0
Cardiopatias (n=45 / 91,8%)	11	84,6*	12	100,00*	7	100,0*	6	85,7*	9	90,0*
Depressão (n=9 / 18,4%)	2	15,4	2	16,7	2	28,6	1	14,3	2	20,0
Diabetes mellitus controlada (n=6 / 12,2%)	1	7,7	3	25,0	1	14,3	0	0,0	1	10,0
Dislipidemia (n=27 / 55,1%)	6	46,2	9	75,0*	4	57,1*	4	57,1*	7	70,0*
Gastrite crônica /esofagite (n=9 / 18,4%)	2	15,4	3	25,0	1	14,3	0	0,0	3	30,0
Hipertensão arterial (n=42 / 85,7%)	11	84,6*	11	91,7*	6	85,7*	7	100,0*	7	70,0*
Obesidade (n=6 / 12,2%)	0	0,0	2	16,7	2	28,6	1	14,3	1	10,0
Osteoporose (n=14 / 28,6%)	2	15,4	4	33,3	4	57,1*	1	14,3	3	30,0
Praticantes de atividade física regular (n=6 / 12,2%)	4	30,8	1	8,3	1	14,3	0	0,0	0	0,0

*Desordens clínicas prevalentes nos diferentes grupos da população estudada, com porcentagem igual ou superior a 50%.

Tabela 3 – Principais medicamentos utilizados pela população estudada

Medicamentos		Controle		ADC		Inflama- ção		Anemia		ADF	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
AAS 100mg (n=16 / 32,6%)		4	30,8	4	33,3	2	28,6	3	42,9	3	30,0
Antiinflamatórios não-esteroidais (n=23 / 46,9%)		6	46,2	7	58,3*	5	71,4*	1	14,3	4	40,0
Antiepléticos (n=4 / 8,2%)	Bloqueadores dos canais de sódio	0	0,0	3	25,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0
Antihipertensi- vos (n= 40 / 81,6%)	Inibidores da ECA [#] (n=24 / 49,0%)	5	38,5	6	50,0*	3	42,9	2	28,6	8	80,0*
	B-bloqueadores (n=19 / 38,8%)	6	46,2	1	8,3	4	57,1*	5	71,4*	3	30,0
	Antagonistas dos canais de cálcio (n=10 / 20,4%)	3	23,1	4	33,3	1	14,3	1	14,3	1	10,0
Antiulcerosos (n=12 / 24,5%)	Inibidores bomba H ⁺	3	23,1	4	33,3	1	14,3	1	14,3	3	30,0
Diuréticos (n=25 / 51,0%)	Diuréticos de alça (n=3 / 6,1%)	2	15,4	0	0,0	0	0,0	1	14,3	0	0,0
	Tiazídicos (n=22 / 45,0%)	2	15,4	9	75,0*	5	71,4*	2	28,6	4	40,0
Hipocolestero- lemiantes (n=31 / 63,3%)	Estatinas (n=30 / 61,2%)	3	23,1	10	83,3*	5	71,4*	4	57,1*	8	80,0*
	Fibratos (n=1 / 2,0%)	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Hipoglicemiantes orais (n=2 / 4,1%)	Sulfonilrérias (n=1 / 2,0%)	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	10,0
	Biguanidas (n=1 / 2,0%)	0	0,0	1	8,3	0	0,0	0	0,0	0	0,0
Inibidores da reabsorção óssea (n=3 / 6,1%)	Amino- bifosfonatos	0	0,0	1	8,3	0	0,0	2	28,6	0	0,0

* Utilizados por 50% ou mais indivíduos do grupo.

[#] Enzima conversora de angiotensina

AAS: ácido acetil salicílico. AAS foi colocado separadamente dos demais antiinflamatórios não-esteroidais, pois a concentração de 100mg é indicada para profilaxia dos infartos e re-infartos do miocárdio.

Tabela 4 - Parâmetros bioquímicos da população estudada

Grupos de estudo	Grupo controle	Grupo ADC	Grupo inflamação	Grupo anemia	Grupo ADF
Albumina (g/dL)	4,0 ± 0,4	3,8 ± 0,3	3,7 ± 0,3	4,0 ± 0,5	3,9 ± 0,3
Creatinina (mg/dL)	1,17 ± 0,298	1,19 ± 0,34	0,9 ± 0,24	0,97 ± 0,24	1,08 ± 0,29
F	24,35 ± 10,7	23,8 ± 15,5	21,4 ± 11,2	29,6 ± 9,4	20,9 ± 6,5
γ GT (U/L)					
M	39,9 ± 31,8	28,2 ± 17,1	17,0*	34,0*	-
Glicemia (mg/dL)	85,0 ± 14,5	104,1 ± 9,3	94,8 ± 17,8	90,4 ± 11,3	89,0 ± 12,5
Proteínas Totais (mg/dL)	7,2 ± 0,7	7,7 ± 0,9	7,7 ± 0,8	7,8 ± 0,4	7,8 ± 0,9

Os dados são reportados como Média ± Desvio padrão

F: sexo feminino; M: sexo masculino

*População com n igual a um

Valores de referência: albumina (3,5-5,5 g/dL); creatinina sérica (0,4-1,3 mg/dL); γ-GT (F: 5-27 U/L; M: 7-45 U/L); glicemia (70-110 mg/dL); proteínas totais (6-8 g/dL).

4.2 Avaliação dos parâmetros hematológicos dos diferentes grupos de estudo

Como os valores de referências dos parâmetros número de eritrócitos, concentração de hemoglobina, índice hematócrito e níveis séricos de ferritina são diferentes para homens e mulheres, estes dados foram analisados separadamente. O número de indivíduos do sexo masculino foi pequeno, o que impossibilitou a análise estatística.

Os parâmetros hematológicos concentração de hemoglobina e índice hematócrito, parâmetros do *status* férrico níveis séricos de ferritina, sTfR e índice sTfR/log ferritina e a concentração de proteína C-reativa foram utilizados para a formação dos 5 grupos de estudo. Outros parâmetros hematológicos também foram avaliados entre os grupos de estudo como número de eritrócitos, os índices hematimétricos VCM, HCM, CHCM e RDW, além do número global de leucócitos, percentual de neutrófilos e monócitos e número de plaquetas. As análises dos parâmetros hematológicos estão representadas nas Figuras 11 a 21 e nas Tabelas 5 a 7. A avaliação do estado do ferro estão representadas nas Figuras 22 a 24 e Tabela 8

Não houve diferença significativa na mediana do número de eritrócitos na população feminina dos grupos de estudo em relação ao grupo controle, quando $p < 0,05$ (Figura 11). O número de eritrócitos da população masculina foi mostrado separadamente na Tabela 5.

Figura 11. Número de eritrócitos, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência número de eritrócitos - Mulheres: 4,2 – 5,2 milhões/mm³.

Tabela 5 – Número de eritrócitos em homens dos diferentes grupos de estudo

	Eritrócitos (milhões/mm ³)
Grupo controle (n= 7)	4,73*
Grupo ADC (n=2)	4,45*
Grupo inflamação (n=1)	4,63

* Os dados são reportados como mediana

Valor de referência número de eritrócitos - Homens: 4,6 - 6,2 milhões/mm³

Em relação aos níveis de hemoglobina em mulheres, houve diferença estatística significativa entre as medianas dos grupos Controle e ADC ($p < 0,01$), Controle e Anemia ($p < 0,05$), Controle e ADF ($p < 0,05$), grupos ADC e Inflamação ($p < 0,01$), Inflamação e

Anemia ($p<0,05$) e Inflamação e ADF ($p<0,05$) (Figura 12). Os níveis de hemoglobina da população masculina são mostrados, separadamente, na Tabela 6.

Figura 12. Níveis de hemoglobina, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p<0,05$. Valor de referência hemoglobina - Mulheres: 12,0 - 16,0 g/dL. Nível de significância: * para $p<0,05$; ** para $p<0,01$.

Tabela 6 - Níveis de hemoglobina em homens dos diferentes grupos de estudo

Hemoglobina (g/dL)	
Grupo controle (n= 7)	13,8*
Grupo ADC (n=2)	12,0*
Grupo inflamação (n=1)	13,3

* Os dados são reportados como mediana

Valor de referência hemoglobina - Homens: 13,0-17,0 g/dL

O índice hematócrito, em mulheres, apresentou diferença estatística significativa entre os grupos Controle e ADC ($p<0,01$), Controle e Anemia ($p<0,05$), ADC e Inflamação

($p<0,01$) e Inflamação e Anemia ($p<0,05$) (Figura 13). O índice hematócrito referente à população masculina foi mostrado separadamente na Tabela 7.

Figura 13. Índice hematócrito, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p<0,05$. Valor de referência hematócrito - Mulheres: 37-47%
Nível de significância: * para $p<0,05$; ** para $p<0,01$.

Tabela 7- Índice hematócrito, em homens, dos diferentes grupos de estudo

	Hematócrito (%)
Grupo controle (n= 7)	46.0*
Grupo ADC (n=2)	40.8*
Grupo inflamação (n=1)	45.0

* Os dados são reportados como mediana

Valor de referência hematócrito - Homens: 40-54%

Na ADF e ADC, os eritrócitos podem se apresentar hipocrômicos e microcíticos dependendo da severidade da anemia. O valor de RDW e os índices hematimétricos não foram estatisticamente diferentes entre os grupos de estudo, com exceção do índice HCM que apresentou diferença estatística significativa entre os grupos Controle e ADC ($p < 0,05$), contudo, com medianas ainda dentro dos valores de referência (Figuras 14 a 17).

Figura 14. Volume corpuscular médio (VCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência VCM: 80 – 98 fL.

Figura 15. Hemoglobina Corpuscular média (HCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência índice HCM: 27 – 32 pg. Nível de significância: * para $p < 0,05$.

Figura 16. Concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência índice CHCM: 32 – 36 g/dL.

Figura 17. Índice RDW dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência índice RDW: 11,5 – 14,5 %.

O número de leucócitos $/\text{mm}^3$ de sangue apresentou diferença estatística significativa entre os grupos Inflamação e ADF ($p < 0,05$), embora as medianas se encontrem dentro dos valores de referência (Figura 18). O maior número de leucócitos $/\text{mm}^3$ de sangue periférico no grupo Inflamação reflete a ocorrência do processo inflamatório. Não houve diferenças no percentual de neutrófilos e monócitos (Figuras 19 e 20) e no número de plaquetas (Figura 21) entre os grupos estudados.

Figura 18. Número de leucócitos /mm³ de sangue dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência leucócitos /mm³ de sangue: 4.500 – 11.000. Nível de significância: * para $p < 0,05$.

Figura 19. Percentual de neutrófilos dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência neutrófilos: 50 - 70 %.

Figura 20. Percentual de monócitos dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência monócitos: 3 - 7 %.

Figura 21. Número de plaquetas /mm³ de sangue dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência plaquetas /mm³ de sangue: 150.000 – 450.000.

4.3. Avaliação do estado do ferro dos diferentes grupos de estudo

Como os valores de referências dos níveis séricos de ferritina são diferentes para homens e mulheres, estes dados foram analisados separadamente. O número de indivíduos do sexo masculino foi pequeno, o que impossibilitou a análise estatística.

Os níveis séricos de ferritina, em mulheres, apresentaram-se diminuídos no grupo ADF em relação aos grupos Controle ($p<0,05$), ADC ($p<0,05$), Inflamação ($p<0,01$) e Anemia ($p<0,05$). Isso reflete a depleção do estoque de ferro em indivíduos com ADF (Figura 22). Os níveis de ferritina sérica referente à população masculina foram mostrados separadamente na Tabela 8.

Figura 22. Níveis séricos de ferritina, em mulheres, dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p<0,05$. Valor de referência ferritina - Mulheres: 6-159 ng/ mL. Nível de significância: * para $p<0,05$; ** para $p<0,01$.

Tabela 8 - Níveis séricos de ferritina em homens dos diferentes grupos de estudo

	Ferritina (ng/mL)
Grupo controle (n= 7)	164.0*
Grupo ADC (n=2)	88.5*
Grupo inflamação (n=1)	227.0

* Os dados são reportados como mediana

Valor de referência ferritina - Homens: 28-397 ng/mL

Os níveis de sTfR do grupo ADF foram significativamente maiores em relação ao grupo controle ($p<0,01$) (Figura 23). Para cálculo dos valores do índice de sTfR/ log ferritina, o valor de sTfR foi transformado para mg/L (SUOMINEN et al., 1998). Os valores do índice sTfR/ log ferritina foram estatisticamente maiores no grupo ADF quando comparados aos grupos Controle ($p<0,001$) e Anemia ($p<0,05$) (Figura 24).

Figura 2. Níveis de sTfR dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p<0,05$.

Valor de referência sTfR: 8 – 28 nmol/L.

Nível de significância: ** para $p<0,01$.

Figura 24. Valores do índice de sTfR/ log ferritina dos grupos controle ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência índice de sTfR/ log ferritina: 0,63 – 1,8. Nível de significância: * para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$.

4.4. Avaliação dos níveis de proteína C-reativa dos diferentes grupos de estudo

Com relação aos níveis da proteína C-reativa, houve diferença significativa entre os grupos Controle e ADC ($p < 0,001$), Controle e Inflamação ($p < 0,001$), ADC e Anemia ($p < 0,05$), ADC e ADF ($p < 0,05$), Inflamação e Anemia ($p < 0,05$), Inflamação e ADF ($p < 0,05$) (Figura 25). A determinação dos níveis de proteína C-reativa é utilizada para diagnóstico de estados inflamatórios e infecções.

Figura 25. Níveis da proteína C-reativa dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$. Valor de referência da proteína C-reativa: até 3 mg/L. Nível de significância: * para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$.

4.5. Avaliação da produção de IL-6 por monócitos em cultura dos pacientes dos diferentes grupos de estudo

Houve diferença significativa entre os grupos ADC e Anemia ($p < 0,05$) (Figura 26). As concentrações de IL-6 correlacionaram-se positivamente com os níveis da proteína C-reativa, com valores de r igual a 0,4237 e p igual a 0,0012 (Figura 27). Houve correlação positiva entre as concentrações de IL-6 e o número global de leucócitos, com valores de r igual a 0,2776 e p igual a 0,0267 (Figura 28).

Figura 26. Concentração de IL-6 em sobrenadantes de cultura de monócitos dos grupos controle, ADC, inflamação, anemia e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$.

Nível de significância: * para $p < 0,05$; *** para $p < 0,001$.

Figura 27. Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e proteína C-reativa. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Figura 28. Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e o número global de leucócitos. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

4.6. Avaliação da expressão de hepcidina por monócitos dos pacientes dos diferentes grupos de estudo

A expressão de hepcidina foi realizada por RT-PCR em Tempo Real, em monócitos, de indivíduos dos grupos Controle, ADC e ADF.

Participaram desta avaliação 19 indivíduos. Duas pacientes eram portadoras de ADC e ADF concomitante participando da análise estatística de ambos os grupos, de modo que os grupos ficaram assim constituídos: grupo Controle -5 indivíduos, ADC -9 indivíduos e ADF - 7 indivíduos. A Tabela 9 mostra a distribuição dos grupos na fase C da pesquisa.

Tabela 9 – Distribuição dos grupos de estudo na fase C do estudo

Grupos de estudo	Sexo (n)	
	Feminino	Masculino
Grupo controle (n=5)	3	2
Grupo ADC (n=9)	8	1
Grupo ADF (n=7)	7	0

Não houve diferença de expressão do gene HAMP nos diferentes grupos estudado (Figura 29). A expressão de hepcidina correlacionou-se, positivamente, com os níveis séricos de ferritina, com valores de r igual a 0,4668 e p igual a 0,0164 (Figura 30).

Não houve correlação entre a produção de IL-6 e expressão de hepcidina nos grupos estudados, como mostra a Tabela 10.

Figura 29. Expressão relativa do gene HAMP, reportada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Log10), em monócitos, dos grupos Controle, ADC e ADF. Os dados são reportados como mediana. Teste de Kruskal Wallis, $p < 0,05$.

Figura 30. Correlação entre expressão relativa do gene HAMP, reportada como $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Log10), em monócitos, e níveis séricos de ferritina. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Tabela 10 – Correlação entre concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos e expressão de hepcidina entre os grupos estudados

Grupo	Valores de “r” e “p”	Significância estatística
População Total	R= -0,05852 e P= 0,4005	Não
Grupo Controle	R= -0,6000 e P= 0,1750	Não
Grupo ADC	R= -0,1667 e P= 0,3389	Não
Grupo ADF	R= 0,2857 e P= 0,2780	Não

4.7. Correlações entre os parâmetros avaliados nos diferentes grupos de estudo

Todos os parâmetros avaliados foram analisados pela correlação de Spearman, com o objetivo não somente de compreender suas relações e interdependências, mas também de verificar a eficiência destes parâmetros no diagnóstico diferencial entre as anemias estudadas. As principais correlações estão representadas nas Figuras 31 a 44.

Na análise de toda população estudada foi possível observar que o RDW correlaciona-se, negativamente: (I) com o número de eritrócitos, com valor de r igual a $-0,2453$ e p igual a $0,0447$; (II) com os níveis de hemoglobina, com valor de r igual a $-0,4031$ e p igual a $0,0020$; e (III) com o índice hematócrito, com valor de r igual a $-0,3735$ e p igual a $0,0041$ (Figura 31).

Figura 31. Correlação entre RDW com: (I) contagem de eritrócitos; (II) níveis de hemoglobina; (III) índice hematócrito. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

O número de leucócitos totais correlacionou-se positivamente com os níveis da proteína C-reativa, com valor de r igual a $0,3012$ e p igual a $0,0177$ (Figura 32) e, como já reportado na Figura 28, com a produção de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos.

No grupo controle, o índice CHCM mostrou correlação positiva com os níveis séricos de ferritina, com valor de r igual a $0,5469$ e p igual a $0,0265$ (Figura 33).

Figura 32. Correlação entre número de leucócitos totais e níveis de proteína C-reativa. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Figura 33. Correlação entre CHCM e níveis séricos de ferritina do grupo Controle. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

No grupo controle, ainda foi observado uma correlação negativa entre o número de eritrócitos da população feminina e a concentração de IL-6, com valor de r igual a $-0,8286$ e p igual a $0,0292$ (Figura 34).

Figura 34. Correlação entre número de eritrócitos das mulheres do grupo Controle e concentração de IL-6 em sobrenadante de cultura . Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

No grupo ADC, os níveis séricos de ferritina correlacionaram-se positivamente com os níveis séricos da proteína C-reativa, com valor de r igual a 0,6200 e p igual a 0,0158 (Figura 35). O índice receptor-ferritina correlacionou-se negativamente com os níveis de proteína C-reativa, com valor de r igual a -0,5664 e p igual a 0,0274 (Figura 36).

Nas mulheres do grupo ADC, os níveis séricos de ferritina correlacionaram-se: (I) positivamente com os níveis séricos de proteína C-reativa, com valor de r igual a 0,6242 e p igual a 0,0269 e (II) negativamente com o índice hematócrito, com valor de r igual a -0,5758 e p igual a 0,0408 (Figura 37).

Figura 35. Correlação entre níveis séricos de ferritina e níveis séricos de proteína C-reativa do grupo ADC. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Figura 36. Correlação entre índice sTfR/log ferritina e níveis séricos de proteína C-reativa do grupo ADC. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Figura 37. Correlação entre níveis séricos de ferritina com: (I) níveis séricos de proteína C-reativa e (II) índice hematócrito, em mulheres do grupo ADC. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

No grupo inflamação, os valores do RDW correlacionaram-se negativamente com o receptor de transferrina solúvel, com valor de r igual a $-0,7568$ e p igual a $0,0331$ (Figura 38).

No grupo Anemia, os níveis séricos de ferritina correlacionaram-se positivamente com: (I) número de eritrócitos, com valor de r igual a $0,8829$ e p igual a $0,0062$, (II) níveis de hemoglobina, com valor de r igual a $0,8214$ e p igual a $0,0171$ e (III) índice hematócrito, com valor de r igual a $0,9643$ e p igual a $0,0014$ (Figura 39). Neste grupo, houve correlação negativa entre os níveis de receptor de transferrina solúvel e o número de eritrócitos, com valor de r igual a $-0,7027$ e p igual a $0,0440$ (Figura 40). Foi ainda observado que o índice receptor-ferritina correlacionou-se negativamente com o número de eritrócitos, com valor de r igual a $-0,7027$ e p igual a $0,0440$ (Figura 41).

Figura 38. Correlação entre RDW e sTfR do grupo Inflamação. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Figura 39. Correlação entre níveis séricos de ferritina com: (I) número de eritrócitos, (II) níveis de hemoglobina e (III) índice hematócrito do grupo Anemia. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Figura 40. Correlação entre sTfR e número de eritrócitos do grupo Anemia. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Figura 41. Correlação entre índice sTfR/log ferritina e número de eritrócitos do grupo Anemia. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

No grupo ADF, os valores de RDW correlacionaram-se negativamente com: (I) níveis de hemoglobina, com valor de r igual a $-0,6056$ e p igual a $0,0318$ e (II) índice hematócrito, com valor de r igual a $-0,5951$ e p igual a $0,0348$ (Figura 42). Os níveis de sTfR, deste grupo, correlacionaram-se negativamente com o número de eritrócitos, com valor de r igual a $-0,6121$ e p igual a $0,0062$ (Figura 43). Observou-se ainda que o índice receptor-ferritina correlacionou-se: (I) negativamente com o número de eritrócitos, com valor de r igual a $-0,5879$ e p igual a $0,0369$ e (II) negativamente com o índice hematócrito, com valor de r igual a $-0,5714$ e p igual a $0,0422$ (Figura 44).

Figura 42. Correlação entre RDW com: (I) hemoglobina e (II) hematócrito do grupo ADF. Correlação de Spearman, $p < 0,05$.

Figura 43. Correlação entre sTfR e número de eritrócitos do grupo ADF. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Figura 44. Correlação entre índice sTfR/log ferritina com: (I) número de eritrócitos e (II) hematócrito do grupo ADF. Correlação de Spearman, $p<0,05$.

Os valores das medianas dos parâmetros hematológicos, níveis séricos da proteína C-reativa, produção de IL-6 e expressão de hepcidina foram apresentados no Apêndice A e as correlações analisadas no Apêndice B.

5. DISCUSSÃO

Segundo a OMS, o envelhecimento da população é um dos maiores triunfos da humanidade e também um grande desafio (OMS, 2005). No Brasil, o crescimento demográfico da população idosa exige a preparação adequada do país para atender as demandas das pessoas com mais de 60 anos de idade, consomem muito mais recursos do sistema de saúde, em relação às demais faixas etárias. Por esse motivo, a Política Nacional de Saúde do Idoso tem como propósito principal a promoção do envelhecimento saudável (GORDILHO et al., 2000). Os valores culturais e as tradições, contudo, ainda determinam muito como uma sociedade encara as pessoas idosas e o processo de envelhecimento. Quando as sociedades atribuem sintomas de doença ao processo de envelhecimento, elas têm menor probabilidade de oferecer serviços de prevenção, detecção precoce e tratamento apropriado, principalmente, quando se trata de doenças não transmissíveis e lesões (OMS, 2005).

Desta forma, torna-se importante reconhecer e saber administrar condições causadoras de morbidade na população idosa. A anemia deve ser um dos alvos das estratégias que visam melhorar a qualidade de vida desses indivíduos. No passado, a anemia era encarada como consequência de uma doença. Atualmente, é considerada causa da diminuição da qualidade de vida, morbidade, declínio das funções físicas e um fator de risco de mortalidade senil (BALDUCCI; ERSHLER; KRANTZ, 2006; GABRILOVE, 2005).

5.1. Características dos grupos de estudo

5.1.1. Prevalência de anemia, idade e sexo da população

Segundo a OMS, a diversidade entre os indivíduos tende a aumentar com a idade (OMS, 2005). Uma das maiores dificuldades encontradas no trabalho foi a constituição de grupos homogêneos. O estudo contou com a participação de 37 mulheres e 10 homens. As médias de idades dos grupos formados não foram diferentes entre si (Tabela 1).

Estudos relatam que os níveis de hemoglobina caem com a idade (ERSHLER et al., 2005), mas a prevalência de anemia na população idosa é variável. Guralnik et al. (2004), estudando uma população com idade superior a 65 anos, encontraram uma prevalência de anemia de 11% em homens e 10,2% em mulheres, semelhante à encontrada por Penninx et al. (2004), em uma população da mesma faixa etária, que foi de 11,1% em homens e 11,5% em mulheres. Izaks, Westendorp e Knook (1999) detectaram uma prevalência de 17% em homens e 28% em mulheres com mais de 85 anos. Olivares et al. (2000), estudando uma população com idade superior a 60 anos, encontrou valores de 5,4% em homens e 4,4% em mulheres. Cesari et al. (2005) encontraram uma prevalência de indivíduos anêmicos de 10,6%, em uma população idosa com mediana de idade de 75 anos. Todos os trabalhos citados utilizaram os valores de referência de hemoglobina estabelecidos pela OMS.

Em nosso estudo, 59,2% dos indivíduos eram anêmicos, considerando os limites de hemoglobina estabelecidos pela OMS (WHO, 2001). Como os pacientes foram recrutados, em grande maioria, no Ambulatório de Cardio-geriatria, era previsível que a prevalência fosse maior, principalmente porque anemia está associada com algumas cardiopatias. Deve-se considerar ainda que foi estudado um pequeno grupo de indivíduos.

A anemia mais freqüente no estudo foi a ADC, presente em 24% dos indivíduos, seguida da ADF, presente em 20% dos indivíduos (Figura 10), dados estes que estão de acordo com a literatura (ANDRÈS et al., 2008; EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006). A ADF em indivíduos dessa faixa etária, sozinha ou combinada com deficiências de folato e/ou vitamina B₁₂, corresponde a 20% de todas as anemias (GURALNIK et al., 2004). Dentre os indivíduos estudados, 14% tinham anemia de causa desconhecida. Indivíduos portadores de hemoglobinopatias e pacientes que apresentaram, na extensão sanguínea corada com Leishman, alterações na morfologia eritrocitária indicativas de hemólise ou anemia megaloblástica não foram incluídos no estudo. Outros 14% da população tiveram níveis de

hemoglobina normais, contudo, apresentaram desordens inflamatórias com níveis de proteína C-reativa superior a 3 mg/L. A separação desse grupo foi necessária devido a interferência das proteínas do processo inflamatório, especialmente a ferritina, no *status* férrico avaliado.

É importante lembrar que o grupo controle foi composto por indivíduos com níveis de hemoglobina superiores aos limites mínimos estabelecidos pela OMS, não portadores de hemoglobinopatias ou desordens clínicas que alteravam o metabolismo de ferro e com níveis de proteína C-reativa inferior a 3 mg/L. Contudo, estes indivíduos não eram isentos de patologias sendo, a maioria deles, pacientes do Ambulatório de Cardio-Geriatria.

Independente das causas, as anemias em indivíduos idosos estão associadas com inúmeras complicações, além de ter efeitos significantes em sua qualidade de vida. Esses efeitos não são observados, apenas, em indivíduos com redução severa das taxas de hemoglobinas, mas também em casos de anemias moderadas, como visto na ADC. As deficiências de nutrientes, principalmente ferro, que representam dois terços das carências nutricionais do idoso, podem estar associadas com algumas manifestações hemorrágicas e também têm grande impacto na saúde e qualidade de vida do idoso (FERRUCCI et al., 2007).

Estudos indicam que as anemias, em uma significativa proporção de pacientes idosos (30 a 50%), possuem causas múltiplas dificultando sua identificação (CARMEL, 2001; WOODMAN; FERRUCCI; GURALNIK, 2005). Alguns trabalhos dividem as causas de anemia em idosos em três grandes grupos: anemia por deficiência de nutrientes, anemia das doenças crônicas e uma classe de anemia denominada de “não-identificadas” (GURALNIK et al., 2004; EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006; WOODMAN; FERRUCCI; GURALNIK, 2005). Muitas teorias têm sido levantadas para explicar a etiologia das anemias “não-identificadas” que incluem: redução do número das células tronco hematopoéticas (CTH), da produção de fatores de crescimento ou da sensibilidade das CTH aos fatores de crescimento; anormalidades no microambiente medular; deficiência de andrógenos; doença

crônica renal não reconhecida; mielodisplasia não diagnosticada; ADC em estágios preliminares (BALDUCCI, 2003); sarcopenia; diminuição significativa da massa corporal, alterando a massa eritróide, a utilização de oxigênio e, provavelmente, a produção de eritropoetina; polifarmacoterapia (GURALNIK et al., 2005).

Outra teoria existente para explicar o aparecimento de anemias em idosos é a produção inapropriadamente baixa de eritropoetina, confirmada em estudos que comparam os níveis de eritropoetina entre jovens anêmicos e idosos com deficiência de ferro (EISENSTAEDT; PENNINX; WOODMAN, 2006).

5.1.2. Desordens Clínicas

Outra dificuldade encontrada no desenvolvimento do trabalho foi a diversidade de desordens clínicas que acometiam os pacientes do estudo. Estabelecemos grupos em que as desordens clínicas estavam presentes em frequências semelhantes nos diferentes grupos de estudo, inclusive no grupo controle (Tabela 2).

Segundo a OMS (2005), as principais doenças crônicas que afetam os idosos em todo o mundo são doenças cardiovasculares e hipertensão. As cardiopatias estavam presentes em 91,8% dos pacientes do nosso estudo, a hipertensão arterial acometeu 85,7% dos indivíduos, seguida pelas dislipidemias, com 55,1%. Pacientes com artrose, artrite, reumatismo ou neurite ciática corresponderam a 49,0% do total enquanto 28,6% tinham osteoporose. A frequência de pacientes com depressão foi igual à de pacientes que sofriam de gastrite crônica/esofagite, num total de 18,4%. Pacientes com diabetes *mellitus* controlada e pacientes obesos corresponderam a 12,2% do total.

Agrawal, Misra e Aggarwa (2006) constataram que a anemia estava presente em dois terços dos pacientes com artrite reumatóide, com prevalências iguais de ADC e ADF, e que a alta prevalência da ADF neste estudo foi justificada pela larga utilização de drogas

antiinflamatórias esteroidais e não-esteroidais, que conduzem a perdas sangüíneas gastrointestinais. Em nosso estudo, 75,0% dos pacientes com ADC e 40,0% dos pacientes com ADF eram portadores de desordens como artrose, artrite, reumatismo ou neurite ciática. Somando todos os indivíduos anêmicos verificamos que 52,0% dos indivíduos eram portadores dessas desordens (Tabela 2).

Outra patologia intimamente relacionada com a prevalência de anemia em idosos são as cardiopatias. ADC é uma comorbidade prevalente em indivíduos com insuficiência cardíaca (IC) podendo desencadear ou acentuar suas manifestações (MORENO, 2007; OKONKO; ANKER, 2004). IC é resultado final de quase todas as doenças cardíacas, incluindo doença coronária arterosclerótica, infarto do miocárdio, doenças valvares, hipertensão, doença cardíaca congênita e cardiomiopatias (BARRETTO; DEL CARLO, 2007).

Como 91,8% dos pacientes eram portadores de alguma cardiopatia, torna-se importante discutir alguns dos mecanismos da relação anemia-IC. A presença de anemia está associada a aumento da mortalidade, sendo que a diminuição de 1g/dL de hemoglobina aumenta a mortalidade em 15,8% (MORENO, 2007), indicando portanto um pior prognóstico da patologia (TERROVITIS et al., 2006).

A prevalência de anemias em pacientes com IC varia de 4 a 55% (EZEKOWITZ; MCALISTER; ARMSTRONG, 2003; HORWICH et al., 2002; KOSBOROD et al., 2003; MOZAFFARIAN; NYE; LEVY, 2003; TANNER, et al., 2002). Essa grande variação é devida as diferenças entre as populações estudadas, métodos de estudo e definição utilizada para anemia. Contudo, a anemia parece ser mais comum em pacientes com a forma grave da doença (SILVERBERG et al., 2000).

A indução de cardiomiopatia isquêmica gera aumento da apoptose mediada por TNF em células eritróides da medula óssea levando à anemia. Os níveis de citocinas pró-

inflamatórias estão elevados proporcionalmente à gravidade da doença, com níveis de TNF e receptor solúvel de TNF inversamente relacionados com a concentração de hemoglobina. A relação dos níveis de EPO com hemoglobina também parece ser anormal na IC (OKONKO et al., 2005).

Embora a relação causal entre IC e anemia permaneça pouco compreendida, há múltiplos mecanismos que tentam explicar o desenvolvimento da anemia (SILVERBERG, 2003) como: hemodiluição, devido à expansão do volume do plasma (ANDRONE et al., 2003); disfunção renal conduzindo a uma diminuição dos níveis de eritropoetina circulante (HILLEGE, 2000); resistência das células da medula óssea à ação da eritropoetina, devido a influência de citocinas inflamatórias; diminuição da perfusão da medula óssea; farmacoterapia, principalmente, o uso de inibidores da ECA. Esses fatores agem simultaneamente em uma complexa interação entre a *performance* cardíaca, ativação inflamatória e neurohormonal, função renal e diminuição da resposta da medula óssea (FELKER et al., 2004).

Seis indivíduos, 12,2% dos pacientes do nosso estudo, declararam praticar regularmente atividade física. Destes, quatro eram do grupo controle recrutados do CEFER da USP de Ribeirão Preto. Segundo a OMS (2005), a participação em atividades físicas regulares e moderadas pode retardar declínios funcionais, além de diminuir o aparecimento de doenças crônicas em idosos saudáveis ou doentes crônicos e reduzir substancialmente a gravidade de deficiências associadas à cardiopatia e outras doenças crônicas.

A hipertensão arterial foi outra freqüente desordem observada na população estudada, atingindo 85,7% dos pacientes. Indivíduos com hipertensão têm altos níveis circulantes de moléculas de adesão intercelular-1 (sICAM-1), IL-6, TNF- α e fibrinogênio, sustentando um possível papel da hipertensão como um estímulo pró-inflamatório (CHAE et al., 2001).

Mecanismos inflamatórios estão envolvidos na patogênese de muitas doenças relacionadas com a idade como Alzheimer, aterosclerose, diabetes tipo-2, sarcopenia e osteoporose (BRUUNSGAARD; PEDERSEN; PEDERSEN, 2001).

Estudos têm encontrado aumento dos níveis de mediadores inflamatórios (BRUUNSGAARD; PEDERSEN; PEDERSEN, 2001), em particular da IL-6, em indivíduos idosos (MAGGIO et al., 2006). É importante salientar que esse aumento tende a ser brando, em contraposição aos estados inflamatórios de doenças agudas ou auto-imunes. Esse estado inflamatório pode ocorrer por mecanismos intrínsecos do envelhecimento e por associação a comorbidades (FERRUCCI et al., 2005).

A “imunossenescência” é um termo recentemente proposto para identificar as mudanças contínuas que ocorrem nas patologias associadas ao envelhecimento. O envelhecimento, por sua vez, está associado a um baixo grau de inflamação crônica, causado pela desregulação da produção de citocinas, que pode ser exacerbada por patologias comuns em idosos. Essa desregulação da produção de citocinas, gerada pelo baixo grau da atividade inflamatória, leva o organismo a adquirir mecanismos de resistência à insulina, desregular o sistema de coagulação, ativar linfócitos, desenvolver dislipidemias e aumentar a atividade catabólica (BRUUNSGAARD; PEDERSEN; PEDERSEN, 2001).

A inflamação afeta a eritropoese, provavelmente de forma mais intensa na ADC (PRICE, 2008). Dessa forma, torna-se extremamente complicado estabelecer uma relação causal da ADC no idoso, pois o próprio processo de envelhecimento pode ser o estímulo inflamatório causador da retenção de ferro.

5.1.3. Medicamentos

A farmacoterapia é um interferente que pode contribuir na instalação, manutenção dos quadros anêmicos e pode desvendar algumas causas de anemias não identificadas.

O uso de medicamentos apresentou frequências semelhantes nos diversos grupos de estudo. Os medicamentos utilizados pela população estudada foram: antihipertensivos (81,6%, sendo 49,0% inibidores da ECA, 38,8% β -bloqueadores e 20,4% antagonistas dos canais de cálcio); hipocolesterolemiantes (63,3%, sendo 61,2% da classe das estatinas e 2,0% de fibratos); diuréticos (51,0%, sendo 45,0% da classe dos tiazídicos e 6,1% de diuréticos de alça); antiinflamatórios não-esteroidais (46,9%); AAS 100mg (32,6%); antiulcerosos (24,5%), antipléticos (8,2%), inibidores da reabsorção óssea (6,1%) e hipoglicemiantes orais (4,1%, sendo 2,0% da classe das sulfonilrías e 2,0% biguanidas) (Tabela 3).

Algumas reações adversas de medicamentos podem contribuir para ocorrência de anemia. Doses terapêuticas de inibidores da ECA, como captopril e enalapril, reduzem a secreção renal de eritropoetina em pacientes com hipertensão, insuficiência renal, policitemia e IC. (FELKER et al., 2004; FYHRQUIST et al., 1989). Terrovitis et al. (2006) relataram uma prevalência de anemia em pacientes hipertensos e com IC, que recebiam altas doses de enalapril, com hematócrito atingindo níveis menores que 37%. No presente estudo 28,6% dos pacientes do grupo Anemia fazia uso de fármacos inibidores da ECA, o que poderia explicar a causa dessa anemia (Tabela 3).

O omeprazol é um inibidor da bomba de prótons utilizado por 25,5% dos pacientes desse estudo e por 30,0% dos indivíduos portadores de ADF (Tabela 3). Estudos suportam a teoria que a hipocloridria induzida pelo uso de omeprazol pode prejudicar a absorção de ferro administrado, por via oral, em indivíduos deficientes em ferro, impedindo uma adequada resposta terapêutica à suplementação de ferro (SHARMA; BRANNON; CARLOSS, 2004).

Os fármacos podem também gerar um quadro anêmico por causarem irritação gástrica e consequente perda sanguínea gastrointestinal. A ADF em idosos é, geralmente, causada por perdas de sangue gastrointestinais devido a esofagites, gastrites, úlceras relacionadas ou não ao uso de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs) e/ou com doenças crônicas como

infecção por *Helicobacter pylori*, hipertensão portal, câncer colo-retal, pólipos malignos e angiodisplasia (CARMEL, 2001).

O termo AINEs compreende analgésicos, antiinflamatórios e antipiréticos, incluindo os inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 (COX-2). O AAS também inibe as enzimas COX de maneira distinta, do ponto de vista molecular, dos inibidores reversíveis competitivos do sítio ativo (BURKE; SMYTH; FITZGERALD, 2006). A utilização do AAS e outros AINEs pode causar hemorragias ocultas em cerca de 70% dos pacientes, além de aumentar a incidência de úlcera péptica em pacientes com artrite reumatóide que usam os fármacos por períodos prolongados (KOROLKOVAS, 2001). Foi demonstrado que os inibidores seletivos da COX-2 são menos propensos, em doses igualmente eficazes, a induzir úlceras gástricas.

Em nosso estudo, 30,0% dos pacientes com ADF eram portadores de gastrite crônicas, 30,0% faziam uso freqüente de fármacos anti-ulcerosos, 40,0% de AINES e 30,0% de AAS 100mg para profilaxia de infarto agudo do miocárdio (Tabela 3).

5.1.4. Parâmetros Bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos foram ferramentas essenciais para exclusão de pessoas com distúrbios renais, hepáticos e portadores de diabetes *mellitus*. Essas exclusões foram necessárias para que a população estudada fosse a mais homogênea possível.

Os níveis plasmáticos de albumina são usados como parâmetro do estado nutricional (JAMES; HAY, 1968) e função hepática (FUHRMAN; CHARNEY; MUELLER, 2004). A determinação da creatinina plasmática é um marcador de função renal mais seguro que a uréia em virtude de sua relativa independência de fatores como a dieta, grau de hidratação e metabolismo protéico (PERRONE; MADIAS; LEVEY, 1993). A determinação de γ -GT apresenta maior especificidade que a fosfatase alcalina e aspartato aminotransferase na avaliação de distúrbios hepáticos, pois não se observa alterações de sua atividade na doença

óssea e na gravidez, como ocorre com a fosfatase alcalina, nem nas doenças do músculo esquelético, como observado para aspartato amino transferase (BORGES, 2002). Valores elevados de glicose de jejum ocorrem em vários tipos de diabetes, intolerância à glicose (MODAN et al., 1985) e doença tireoidiana (SILVA, 2005). As proteínas totais podem estar relacionadas com o diagnóstico de certas doenças correlacionadas com a alteração da quantidade de proteínas nos fluidos biológicos (ZAIA; ZAIA; LICHTIG, 1998).

Os valores médios encontrados na avaliação dos parâmetros bioquímicos estavam dentro dos limites de normalidade (tabela 4). Alguns pacientes apresentaram níveis de γ -GT discretamente acima dos valores de referência, entretanto eles não foram excluídos do estudo por este ser um provável efeito adverso do fármaco sinvastatina.

5.2. Parâmetros hematológicos

Para diagnosticar e classificar as anemias apresentadas pelos pacientes foi utilizado os parâmetros hematológicos, incluindo a análise da extensão sangüínea corada por Leishman, e a presença de condição inflamatória determinada pela concentração de proteína C-reativa e consulta aos prontuários clínicos.

A ADF é uma anemia que pode ser leve ou grave. Na forma leve apresenta-se como uma anemia microcítica, com VCM menor que 80fL e hemoglobina entre 9-12g/dL. Na forma grave, observa-se, na extensão de sangue periférico, células acentuadamente hipocrômicas e microcíticas e presença de poiquilocitose com presença de eritrócitos em alvo e ovalócitos (RAPPAPORT, 2000; FALCÃO; CALADO, 2005).

A ADC é uma anemia que, geralmente, se manifesta com intensidade leve a moderada, com níveis de hemoglobina entre 9 e 12 g/dL e hematócrito entre 25 a 40%. Os eritrócitos são normocrômicos e normocíticos, embora em 50% dos casos sejam hipocrômicos e, em 20 a 50%, microcíticos. Na extensão do sangue periférico, pode-se observar anisocitose e

poiquilocitose discretas (CANÇADO; CHIATTONE, 2002). A ADC pode coexistir com a deficiência de ferro e, nestes casos, a anemia tende a ser mais grave apresentando um maior grau de microcitose (BRUGNARA, 2003).

Em nosso estudo, conforme previamente estabelecido, os níveis de hemoglobina estavam diminuídos em todos os grupos de pacientes anêmicos (Figura 12). A determinação dos níveis de hemoglobina foi o método utilizado para diagnosticar anemia, contudo, ela não permite classificar as anemias devido à sua baixa especificidade (FALCÃO; CALADO, 2005). Indivíduos com estoques normais de ferro podem perder uma grande quantidade de ferro antes que os níveis de hemoglobina caiam. A anemia é uma manifestação tardia e insidiosa da carência, que surge quando as reservas orgânicas esgotam-se, em virtude do balanço negativo (FALCÃO; CALADO, 2005). Esse estágio de depleção dos estoques de ferro com níveis normais de hemoglobina é denominado deficiência de ferro (DF) (COOK, 2005).

O número de eritrócitos, o índice hematócrito e o RDW são ferramentas que auxiliam o diagnóstico da anemia. O índice hematócrito estava diminuído nos grupos ADC e Anemia em relação ao grupo controle (Figura 13). O número de eritrócitos e o RDW não variaram significativamente entre os grupos estudados (Figuras 11 e 17). O RDW apresentou correlação negativa com o número de eritrócitos, níveis de hemoglobina e índice hematócrito na população total e com níveis de hemoglobina e índice hematócrito no grupo ADF (Figuras 31 e 42).

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM determinam, respectivamente, o volume médio dos eritrócitos, o conteúdo médio de hemoglobina existente em cada eritrócito e a concentração de hemoglobina em um volume de eritrócitos. Eles são úteis na classificação das anemias e podem fornecer informações sobre a patofisiologia destas desordens (LORENZI, 1999). Em nosso estudo, o HCM se apresentou diminuído no grupo ADC (Figura

15). Os outros índices não apresentaram diferença significativa entre os grupos (Figuras 14 e 16).

O diagnóstico de DF ou ADF requer evidências de que os estoques de ferro estão debilitados (BARRON; HOYER; TEFFERI, 2001). A ferritina foi o parâmetro mais usado para avaliar o *status* férrico, durante um quarto de século, pois sua concentração sérica é diretamente proporcional aos estoques de ferro do organismo. Os níveis de ferritina, contudo possuem valores de referência que abrangem uma faixa larga (6 a 159 ng/mL para mulheres e 28 a 397 ng/mL para homens) e seus níveis aumentam com a idade (JOOSTEN, 2004). Outro problema no uso da ferritina para diagnóstico de depleção dos estoques de ferro é que, sendo uma proteína de fase aguda, os níveis de ferritina elevam-se em inflamações crônicas, malignidades ou doenças hepáticas, independentemente do *status* férrico.

O diagnóstico da deficiência de ferro seria simples se não fossem as desordens clínicas que influenciam o ciclo do ferro e mimetizam algumas das mudanças observadas na ADF, como ocorre na inflamação crônica. Quando ADC coexiste com deficiência de ferro, a interpretação clínica dos resultados é dificultada (CANÇADO; CHIATTONE, 2002). A proteína C-reativa é geralmente considerada o melhor marcador de inflamação, mas os graus de elevação que invalidam os níveis de ferritina sérica ainda não estão definidos (COOK, 2005).

Os níveis séricos de ferritina da população feminina estavam diminuídos nos pacientes com ADF em relação aos outros grupos estudados (Figura 22). No grupo controle, a ferritina mostrou correlação negativa com o índice CHCM (Figura 33). No grupo ADC, seus níveis correlacionaram-se, negativamente, com o índice hematócrito (Figura 37), o que comprova que o estado anêmico nesse grupo está relacionado à hiperferritinemia. No grupo Anemia, os níveis de ferritina mostraram um padrão oposto àquele observado no grupo ADC

correlacionando-se positivamente, com o número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito (Figura 39).

No final da década de 70 e início de 80, trabalhos publicados sugeriram a necessidade de se trabalhar com valores de normalidade próprios para a população com idade superior a 65 anos (HTOO; KOFKOFF; FREEDMAN, 1979; LIPSCHITZ; MITCHELL; THOMPSON, 1981). Nilsson-Ehle et al. (2000), comparando os níveis de hemoglobina estabelecidos pela OMS com dados epidemiológicos para a faixa de idade de 70 a 88 anos, defenderam que o limite inferior de hemoglobina para homens idosos deveria cair para 11,6g/dL e para mulheres idosas, 11,4g/dL, sem prejuízo para a saúde da população e a qualidade de vida.

A OMS preconiza que valores de ferritina inferiores a 15 ng/mL são sugestivos de depleção dos estoques de ferro, para ambos os sexos, contudo, ela alerta que variações significantes podem ocorrer quando se analisa grupos etários distintos (WHO, 2001). Trabalhos recentes utilizam o limite inferior de 50 ng/mL para diagnóstico fidedigno da deficiência de ferro em idosos (JOOSTEN, 2004; KOULAOUZIDIS et al., 2009; MARKOVIC; MAJKIC-SINGH; SUBOTTA, 2005), principalmente, quando a deficiência de ferro coexiste com outras patologias como inflamação, infecção e malignidade (KOULAOUZIDIS et al., 2009). Embora a OMS não tenha estabelecido limites específicos para os níveis de ferritina em idosos, no presente estudo, utilizamos o limite inferior de 50 ng/mL para diagnosticar deficiência de ferro nessa população, conforme recentemente descrito.

Além da evidência da depleção dos estoques de ferro, o diagnóstico da DF requer a demonstração da deficiência de ferro tissular. A captação do ferro do plasma pelos precursores de células eritróides é regulada pela expressão de receptores de transferrina nestas células. A forma solúvel do receptor de transferrina está diretamente correlacionada com a massa total de precursores eritróides (BEGUIN, 2003) e é um marcador de deficiência tissular

de ferro, pois aumenta na proporção da severidade do déficit de ferro (BRUGNARA, 2003). Os níveis de sTfR, mostraram um aumento significativo no grupo ADF em relação ao grupo Controle (Figura 23), o que reflete a tentativa de aumentar a captação de ferro para compensar a produção diminuída de hemoglobina. Houve correlação negativa nos níveis de sTfR com o número de eritrócitos no grupo Anemia e ADF (Figuras 40 e 43). No grupo Inflamação os níveis de sTfR correlacionaram-se, negativamente, com os valores do RDW (Figura 38).

O índice que relaciona os dois parâmetros sTfR e ferritina representa a quantidade de ferro corporal (COOK; FLOWERS; SKIKNE, 2003) e segundo alguns autores, aumenta a sensibilidade e especificidade da medida de cada um dos parâmetros isolados (MARKOVIC et al., 2007; SUOMINEN et al., 1998). Nossos estudos mostraram um aumento significativo do índice sTfR/log ferritina no grupo ADF em relação aos grupos Controle e Anemia (Figura 24). No grupo ADF, os valores do índice apresentaram correlação negativa com o número de eritrócitos e hematócrito (Figura 44). No grupo Anemia, o índice correlacionou-se negativamente com o número de eritrócitos (Figura 41), mostrando um perfil semelhante aos pacientes com ADF. É importante ressaltar que, analisando as correlações do grupo Anemia, verifica-se que estes pacientes não se enquadram no perfil esperado para os pacientes com ADC, demonstrando que a anemia, nesse grupo, possui uma etiologia diferente.

A maior vantagem de utilizar a determinação do sTfR é que sua concentração não é afetada pela inflamação, portanto, na ADC o nível de sTfR não é afetado pela reduzida concentração de ferro no plasma, nem pelo aumento dos níveis de citocinas (JAYARANEE; STHANESHWAR, 2006). A determinação dos níveis do sTfR pode ajudar na diferenciação entre pacientes com ADC, que tem ferritina normal a aumentada e sTfR reduzido, e pacientes com ADC e deficiência de ferro com níveis reduzidos de ferritina e altos níveis de sTfR (BRUGNARA, 2003). Entretanto, estudos sobre sua utilização e eficácia em idosos são escassos. Choi (2005), relata que os níveis de sTfR não oferecem vantagem sobre a ferritina

na avaliação de estágios precoces e intermediários da deficiência de ferro, indicando a necessidade de mais estudos sobre sua utilização. A falta de padronização internacional é uma desvantagem e ainda limita a utilização do sTfR (COOK, 2005).

Com base nos critérios estabelecidos neste estudo, identificamos a presença de ADF em 10 pacientes, sendo que um deles possuía ferritina superior a 50 ng/mL, com níveis de receptor e índice sTfR/log ferritina indicativos de ADF. Segundo Holyoake et al. (1993) níveis de ferritina superiores a 50 ng/mL podem ser encontrados em idosos deficientes em ferro. O índice sTfR/log ferritina manteve-se normal em seis pacientes e o sTfR em cinco deles, o que parece contradizer os trabalhos que defendem a maior sensibilidade do índice para diagnóstico de deficiência de ferro. Entretanto, como utilizamos um limite para os níveis de ferritina maior que o preconizado pela OMS, para o índice receptor-ferritina ter a mesma sensibilidade diagnóstica que o sTfR, no diagnóstico de ADF, os valores de normalidade devem ser revistos. Rimon et al. (2002) preconizaram que índice receptor-ferritina maior que 1,5 diagnostica deficiência de ferro, dessa forma nenhum dos pacientes do grupo ADF com níveis de sTfR aumentados teria índice normal.

Como citado acima, cinco pacientes do grupo ADF tiveram valores de sTfR dentro dos limites da normalidade. Uma possível explicação para este achado, é que o TfR pode sofrer danos pelo processo de nitração. Kotamraju e cols (2003) documentaram que TfR nitrados são alvos de degradação proteossomal. Odemis e cols (2007), em um estudo com crianças deficientes em ferro, relataram que os níveis de óxido nítrico ($\bullet$ NO) estão aumentados. O peroxinitrito (ONOO-) é uma espécie reativa de nitrogênio, formada com $\bullet$ NO, que age tanto fisiologicamente como em processos inflamatórios, estando associado com os efeitos adversos da inflamação e com o dano tissular. O ONOO- induz a oxidação de grupos sulfidrilas e tioéster, nitração e hidroxilação de compostos aromáticos, tais como tirosina, triptofano e

guanina (CUZZOCREA, 2006). O TfR, como possui resíduos de tirosina, pode ser sítio de ação de espécies reativas como ONOO- (KOTAMRAJU et al., 2003).

Outra hipótese para tentar explicar os níveis normais dos receptores de transferrina nos pacientes com ADF, é que concentrações de ácido hipocloroso (HOCl), um produto reativo produzido por neutrófilos e gerado pela reação da mieloperoxidase durante o processo inflamatório, podem modular negativamente a expressão de TfR, por antagonizarem a ativação da IRP-1 (MUTZE et al., 2003). Em um outro trabalho realizado pelo Laboratório de Hematologia Clínica da FCFRP/USP, com os mesmos pacientes desse estudo, verificou-se que: o grupo ADC apresentou uma superprodução de $\bullet\text{NO}$, estatisticamente significativa, acima de 50 μM , em monócitos; concentrações exacerbadas de $\bullet\text{NO}$ foram também demonstradas nos grupos inflamação, anemia e ADF, embora sem significância estatística; concentrações menores que 15 μM de HOCl foram encontradas nos grupos ADC, ADF e Inflamação (PAÍNO, 2008). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar essas hipóteses.

5.3. Proteína C-reativa

Para confirmar o diagnóstico da ADC foi essencial a utilização de um marcador laboratorial de processos inflamatórios capaz de determinar a ocorrência de processos inflamatórios de baixo grau. A proteína C-reativa foi escolhida por ser um marcador de inflamação sistêmica estável e confiável (FRANCISCO; HERNÁNDEZ; SIMÓ, 2006).

A dosagem da proteína C-reativa vem sendo utilizada, desde a década de 70, para diagnóstico de estados inflamatórios e infecções, como marcador clássico de fase aguda e indicativo de reações inflamatórias (BRASIL et al., 2007). Outras proteínas, como a α -1-glicoproteína e o fibrinogênio, têm seus níveis aumentados durante os processos de fase

aguda, podendo também atuar como marcadores de atividade inflamatória, contudo, a proteína C-reativa é o marcador mais sensível (PICCIRILLO, et al., 2004).

A proteína C-reativa é sintetizada nos hepatócitos em resposta a citocinas, como IL-6 e TNF- α , e tem uma meia vida plasmática de 19 horas. Ela se liga a fosfatidilcolina causando dano na membrana celular, ou em células apoptóticas que são reconhecidas por C1q ou fator H, ativando o sistema complemento (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003; ROBERTS et al., 2001). Evidências mostram o papel da proteína C-reativa como mediadora da imunidade inata, responsável por efeitos fisiopatológicos pró-inflamatórios e na prevenção da auto-imunidade (PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003; VERMA; SZMITKO; YEH, 2004). Estudos têm demonstrado suas propriedades na adesão de neutrófilos, ativação endotelial, produção de citocinas e óxido nítrico e na progressão da aterosclerose (VERMA et al., 2002).

Níveis pouco elevados da proteína C-reativa são observados em inflamações crônicas (MAZER, RABBANI, 2004). A metodologia ultra-sensível foi desenvolvida para o diagnóstico de estados inflamatórios crônicos que tem importância no desenvolvimento e progressão da aterosclerose (ROBERTS et al., 2001), pois os ensaios tradicionais não eram suficientemente sensíveis para monitorar mudanças na inflamação crônica (RIFAI; RIDKER, 2001; OCKENE et al., 2003).

A proteína C-reativa determinada por ensaios ultra-sensíveis (CHEW et al., 2001; YEH; WILLERSON, 2003; RIFAI; RIDKER, 2001) e níveis elevados de outros biomarcadores inflamatórios, como IL-6, fibrinogênio e número de leucócitos (BODI et al, 2005; LINDMARK et al., 2001; YEN et al., 2003), têm sido utilizados para prever eventos cardiovasculares, síndromes coronárias agudas, pois reflete um baixo grau de inflamação sistêmica (OCKENE et al., 2003; RIFAI; RIDKER, 2001). O aumento da produção de proteína C-reativa está associado ao risco de ocorrência desses eventos mesmo em indivíduos saudáveis (PICCIRILLO et al., 2004). Altos níveis de proteína C-reativa dosada pela

metodologia ultra-sensível foram demonstrados em indivíduos fumantes (TRACY et al., 1997), em pacientes portadores de osteo-artrite (SPECTOR et al., 1997) e em indivíduos obesos (YUDKIN et al., 1999). Desordens inflamatórias crônicas, incluindo doenças auto-imunes e malignidades, podem produzir aumentos persistentes nas concentrações séricas da proteína C-reativa (ROBERTS et al., 2001). Na população adulta, existem especulações se a elevação da proteína C-reativa é consequência ou está diretamente envolvida na fisiopatologia das doenças crônicas (BRASIL et al., 2007; PICCIRILLO et al., 2004).

Estudos prospectivos têm tentado padronizar a utilização dos níveis de proteína C-reativa no risco cardio-vascular (ROBERTS et al., 2001). Ridker (2004) preconiza que níveis, determinados pela metodologia ultra-sensível, menores que 1, entre 1 e 3 e maiores que 3 mg/L correspondem, respectivamente, a baixo, moderado e alto risco. Brasil et al. (2007), trabalhando com um grupo de crianças e adolescentes com e sem sobrepeso encontraram valores da proteína C-reativa superiores a 10mg/L como preditivos de inflamação ou infecção em atividade, e relatam que a maioria dos indivíduos, que não se encontravam acima do peso, possuíam níveis de proteína C-reativa inferiores a 2,0 mg/L. Em nosso estudo não foram encontrados valores superiores a 10mg/L, não havendo, portanto, evidências de processos infecciosos.

Como não era nosso objetivo prever risco cardiovascular, mas sim identificar processos inflamatórios sistêmicos de baixo grau, utilizamos o valor de 3,0 mg/L como limite superior de normalidade para níveis séricos de proteína C-reativa, de acordo com as recomendações do fabricante do kit diagnóstico. Nos grupos ADC e Inflamação, os valores de medianas foram significativamente maiores, em relação aos demais grupos (Figura 25). É interessante reportar que os níveis da proteína C-reativa correlacionaram-se, positivamente, com os níveis de ferritina no grupo ADC, outra proteína inflamatória, e negativamente com o índice receptor-ferritina (Figuras 36 e 37). Na população total estudada, os valores da proteína

C-reativa correlacionaram-se positivamente com o número de leucócitos totais no sangue periférico (Figura 32).

5.4. Produção de IL-6 por monócitos em cultura

Citocinas pró-inflamatórias são observadas em um número de doenças associadas com o envelhecimento como artrite reumatóide, *diabetes mellitus*, infecções, cânceres, doenças cardiovasculares, doença cérebro-vascular, tabagismo e obesidade (ERSHLER, 2003). Evidências sugerem que o aumento da idade, por si só, pode contribuir para o aumento de citocinas pró-inflamatórias, observado em idosos com nenhuma evidência de doença crônica ou inflamação (ERSHLER; KELLER, 2000), e que este aumento está implicado diretamente no desenvolvimento de anemias através da inibição da eritropoetina ou por interferência do metabolismo normal do ferro (ERSHLER, 2003; JOOSTEN et al., 1992).

A expressão do gene da IL-6 é finamente regulada, em condições fisiológicas. O gene tem múltiplos sítios regulatórios e diferentes mecanismos estão envolvidos na ativação da expressão da IL-6 em diferentes tecidos. Muitos fatores de transcrição, incluindo os fatores nuclear (NF)- κ B e NFIL-6, fatores hormonais, como os andrógenos e estrógenos, e glicocorticóides regulam a expressão de IL-6 (ERSHLER, 2003).

Citocinas produzidas por monócitos e macrófagos são os principais mediadores da inflamação (CHEN; CHENG, 2009). Na ausência de infecção, citocinas de sítios inflamatórios podem contribuir para *up-regulation* ou *down-regulation* da produção de outras citocinas, o que contribui para a patogênese das doenças inflamatórias (DANIS, et al. 1995).

Segundo Friberg et al. (1994) a determinação dos níveis séricos de citocinas pode não refletir o potencial de produção de citocinas devido à meia-vida das citocinas e a presença de inibidores. Em indivíduos jovens saudáveis, os níveis de IL-6 no soro, geralmente, são indetectáveis (ERSHLER, 2003). Como IL-6 é produzida principalmente por monócitos e

macrófagos (WILLIS et al 2003; SANCEAU et al., 1991), avaliamos a produção de IL-6, *in vitro*, em cultura de monócitos.

Vários trabalhos pesquisaram alterações na produção de citocinas em determinadas patologias ou condições fisiológicas através da cultura de monócitos ou células mononucleares sob estímulos (WILLIS et al., 2003; KATIAL et al., 1998; MUNOZ et al., 1991; BESSLER et al., 1999). Bergman et al. (2004) avaliaram a produção *in vitro* de IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, e TNF- α , por células mononucleares do sangue periférico, de 20 indivíduos com ADF e encontraram diferenças apenas nos níveis de IL-2, que estavam diminuídos. Em um estudo semelhante, Jason et al. (2001) encontraram diminuição dos níveis de IL-8 e aumento dos níveis de IL-6 em crianças com deficiências de ferro crônicas. Em nosso estudo, não houve alterações na produção de IL-6 nos indivíduos dos grupos ADC e ADF quando comparados ao grupo controle, embora tenha ocorrido aumento não significativo da mediana do grupo ADC. O grupo ADC mostrou uma produção de IL-6 significativamente maior que a do grupo Anemia (Figura 26).

Observamos uma correlação positiva entre a concentração de IL-6 e níveis da proteína C-reativa na população estudada (Figura 27). Segundo Roberts et al. (2001), os níveis da proteína C-reativa são controlados, principalmente, pelos níveis de IL-6. Outra evidência de que a produção de IL-6, por monócitos em cultura, tende a acompanhar os estados inflamatórios dos pacientes, foi a correlação positiva encontrada entre a produção de IL-6 e o número de leucócitos totais (Figura 28).

Starkie et al. (2001) verificaram correlação do aumento dos níveis séricos de mediadores inflamatórios, como TNF- α , IL-1 α e IL-6, em indivíduos após exercício físico, com o aumento do número de monócitos que responderam à estimulação do LPS produzindo citocinas. Kamimura et al. (2007) não encontraram correlação entre a IL-6 secretada por monócitos em cultura e os níveis séricos de IL-6, em pacientes submetidos à hemodiálise.

Neste trabalho, Kamimura et al. (2007) também verificaram que a produção de IL-6 foi mais alta em pacientes idosos com níveis normais de proteína C-reativa do que em jovens do grupo controle, suportando a hipótese que a inflamação sozinha não causa elevação da IL-6 em idosos e que a idade pode contribuir para este aumento.

Outros estudos demonstraram mudanças nos níveis de IL-6 após a menopausa ou andropausa, na ausência de doenças ou estado inflamatórios. Mckane et al. (1994), estudando mulheres de 24 a 80 anos de idade, demonstraram que os níveis de IL-6 triplicaram durante o envelhecimento ($p < 0,001$). Kania et al. (1995) encontraram níveis plasmáticos aumentados de IL-6 em mulheres saudáveis com idade avançada ($p < 0,0001$) e esses níveis de IL-6 correlacionaram-se, positivamente, com o *status* pós-menopausa ($p < 0,0001$). Giuliani et al. (2001) reportaram que os níveis séricos de IL-6 aumentaram exponencialmente com a idade, a mediana aumentou de 1,16 pg/mL em mulheres na pré-menopausa para 10,27 pg/mL em mulheres centenárias. Um fato interessante do trabalho de Giuliani et al. (2001) foi que a dosagem do receptor solúvel de IL-6 (sIL-6) na população aumentou progressivamente até a sétima década de idade, e então, começou a declinar, chegando a atingir, em indivíduos centenários, níveis semelhantes aos de indivíduos jovens. Essa redução do sIL-6 parece modular o estado pró-inflamatório sendo um fator de longevidade de indivíduos centenários.

Alguns pesquisadores estudaram a relação dos níveis séricos da IL-6 com anemia e encontraram dados conflitantes. Penninx et al. (2004) encontraram níveis significativamente aumentados de IL-6, TNF- α e proteína C-reativa em idosos anêmicos. Ferrucci et al. (2005) relatou níveis aumentados de IL-6, TNF- α , proteína C-reativa e IL-1 e diminuídos de eritropoetina, em pacientes idosos anêmicos. Contudo, Kamenetz et al. (1998) verificaram que os níveis de IL-6 em indivíduos idosos anêmicos eram mais baixos que em indivíduos não anêmicos, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Ferrucci et al. (2007), estudando idosos com anemias de causas inexplicadas, não encontrou diferenças

significativas entre as concentrações de IL-6, TNF- α e proteína C-reativa. A discrepância dos resultados pode ser explicada por vários fatores capazes de alterar os níveis de IL-6 circulantes. Alimentos ricos em gorduras, mas não de carboidratos elevam os níveis de IL-6 enquanto vitamina E e ácido ascórbico reduzem seus níveis (NAPPO et al., 2002). Indivíduos praticantes de atividades físicas regulares apresentam níveis menores de IL-6 e outros marcadores inflamatórios (BRUUN et al., 2005). Doenças como osteoporose, diabetes, artrite reumatóide, dentre outras, alteram de diferentes formas o perfil de IL-6 (MAGGIO et al., 2006).

Embora, o papel fisiológico da IL-6 tenha sido mais estudado no contexto da resposta de fase aguda, há uma crescente evidência que a IL-6 também exerce um papel na patogênese de doenças crônicas (MAGGIO et al., 2006), assim como a proteína C-reativa. Entretanto, existem evidências que a IL-6 causa anemia por outros mecanismos, incluindo hemodiluição, provocada pelo rápido aumento do volume plasmático durante a administração de IL-6 recombinante (SUN et al., 1993; NIEKEN et al., 1995), *down*-regulação do receptor da eritropoetina ligado à membrana e diminuição da proliferação e maturação eritróide (MAGGIO et al., 2006).

5.5 Expressão de hepcidina por monócitos

A hepcidina constitui uma importante ligação entre defesa primária, inflamação e o metabolismo do ferro (NEMETH et al., 2004). Sua síntese é aumentada fisiologicamente se a concentração de ferro plasmática está elevada (LIN et al., 2007; PIGEON et al., 2001) diminuída pela atividade da eritropoetina (PARK et al., 2001) e aumentada patologicamente pela inflamação (NEMETH et al., 2003; PIGEON et al., 2001). Mutações homozigóticas no gene que codifica a hepcidina são responsáveis por casos de hemocromatose juvenil (KEMNA et al., 2007). Níveis diminuídos de hepcidina são encontrados em pacientes com

hemocromatose Tfr2 (NEMETH et al., 2005) e na sobrecarga de ferro secundária como nas talassemias intermediária e maior (PAPANIKOLAOU et al., 2005) e na hepatite crônica tipo-C (FUJITA et al., 2007).

Durante os últimos anos, vários estudos foram feitos para estabelecer o papel da hepcidina e sua ligação com citocinas inflamatórias. Usando ratos e humanos como modelos experimentais, foi demonstrado que IL-6 age diretamente em hepatócitos estimulando a produção de hepcidina que, por sua vez, atua como um regulador negativo da absorção de ferro intestinal e liberação de ferro do macrófago (ANDREWS, 2004; GANZ 2006b; NEMETH et al., 2004). A associação entre hepcidina e IL-6 é de grande importância em indivíduos idosos, visto que os níveis de citocinas pró-inflamatórias tendem a aumentar com a idade. A expressão de hepcidina pode ocorrer também por uma via independente de IL-6 (PEYSSONNAUX et al., 2006).

Até recentemente, estudos estiveram mais focados na expressão de RNAm de hepcidina em culturas de células, em modelos animais, e na urina que nas concentrações plasmáticas do hormônio, porque medidas de suas concentrações plasmáticas ainda encontram muitas limitações técnicas (ROE et al., 2007). Muitos estudos sobre seu papel têm sido comprometidos pela ausência de padronização e métodos analíticos precisos. Por esse motivo, alguns pesquisadores questionam se as concentrações de hepcidina urinária e plasmática refletem o *status* férrico do organismo (SWINKELS; DRENTH, 2008).

A maioria dos estudos em humanos utiliza determinações urinárias baseadas na extração seletiva da hepcidina por cromatografia de troca catiônica e detecção por *immunodot* com anticorpo antihepcidina e quimioluminescência (NEMETH et al., 2004). A diluição da urina é normalizada pela determinação da creatinina urinária. Esse ensaio é trabalhoso e depende de uma relação entre os níveis de hepcidina urinária normalizada e suas concentrações plasmáticas. Nemeth et al. (2003) encontraram correlação entre a excreção de

hepcidina urinária e os níveis de ferritina sérica. Ganz et al. (2008) relataram boa correlação entre concentrações urinárias e séricas de hepcidina em indivíduos saudáveis, contudo o mesmo não ocorre em pacientes com doenças renais. Também são utilizados ensaios baseados em espectrometria de massa, mas a maioria são semiquantitativos (KEMNA et al., 2005a; KEMNA et al., 2007; LUUKKONEN; PUNNONEN, 2006; MURPHY et al., 2007; TOMOSUGI et al., 2006).

Ganz et al. (2008) desenvolveram um imunoensaio enzimático competitivo (C-ELISA) para hepcidina humana usando peptídeos sintéticos funcionais que, possivelmente, detecta de forma exata e reprodutiva mudanças fisiológicas e patológicas nos níveis de hepcidina no soro e na urina. Posteriormente, Koliaraki et al. (2009) desenvolveram um método ELISA alternativo para quantificação sérica da hepcidina humana, usando um peptídeo recombinante funcional *hepcidin25-His*, produzido pelo fungo *Pichia pastoris*, e um anticorpo policlonal contra esse peptídeo, que permitia identificar a hepcidina nativa. Nesse trabalho, pacientes portadores de Linfoma Hodgkin, que tinham níveis de IL-6 aumentados, apresentaram altos níveis de hepcidina, mostrando que a IL-6 está diretamente envolvida na sua síntese. Infelizmente, esses ensaios que determinam as concentrações do peptídeo maduro não estão disponíveis no mercado.

Tem sido postulado que os níveis séricos de hepcidina apresentam uma variação diurna similar à que ocorre com as concentrações de ferro sérico. Os níveis séricos de hepcidina também apresentam variações entre os sexos (29 a 254 ng/mL para homens e 16 a 288 ng/mL em mulheres). Essa diferença entre os sexos é provavelmente resultante dos baixos estoques de ferro nas mulheres. A cinética da resposta da hepcidina ao ferro parece ser complexa porque os hepatócitos respondem à massa de ferro do sangue portal bem como a do sangue sistêmico e, por sua vez, mudanças na hepcidina têm efeito nas concentrações de ferro por afetar a liberação de ferro dos enterócitos, macrófagos e estoques hepáticos (GANZ et al.,

2008). Variações da absorção de ferro nos indivíduos podem ocorrer por diferenças de concentrações interindividuais de hepcidina (ROE et al., 2009).

Desde que a hepcidina foi associada à regulação do metabolismo do ferro, tem sido pesquisada a relação da concentração do pró-hormônio com parâmetros do *status* fêrrico. Kulaksiz et al. (2004) não encontraram correlação entre pró-hepcidina circulante e os níveis séricos de ferro, ferritina e saturação da transferrina. Outros trabalhos relatam que a pró-hepcidina não responde a estímulos fisiológicos, como inflamação, (KEMNA et al., 2005b), nem à absorção de ferro e não se correlaciona com os parâmetros fêrricos ou hepcidina sérica (KEMNA et al., 2005b; ROE et al., 2007). Theurl et al. (2006) descreveram que o aumento das concentrações séricas da pró-hepcidina ocorreu, paralelamente, à diminuição da expressão da ferroportina em monócitos circulantes de pacientes com ADC.

Para dosagem da pró-hepcidina, foi padronizado um imunoensaio, que utiliza anticorpos que reconhecem a pró-região, aminoácidos 25–59, e a pró-hepcidina, aminoácidos 25–84 (figura 45) (VALORE; GANZ, 2008). A disponibilidade desse imunoensaio no mercado é restrita e a medida parece não refletir as concentrações do peptídeo maduro em situações fisiológicas ou patológicas (HUANG et al., 2008; KULAKSIZ et al., 2004; LUUKKONEN; PUNNONEN, 2006).

Figura 45. Sequência de aminoácidos do precursor da hepcidina. Adaptado de KULAKSIZ et al., 2004.

Estudos que correlacionam a expressão hepática de RNAm de hepcidina com parâmetros hepáticos são frequentes na literatura (BARISANI et al., 2008; BRIDLE et al., 2003; GEHRKE et al., 2003) e alguns deles mostraram boas correlações entre os níveis do transcrito hepático e os parâmetros que avaliam o *status* férrico. Contudo, para avaliar a expressão hepática do gene é necessário realizar biópsia de tecido hepático, um procedimento invasivo. Dessa forma, Theurl et al. (2008) avaliaram a expressão de hepcidina por monócitos e verificaram que a expressão estava significativamente aumentada em pacientes com ADC. Diante das dificuldades técnicas acima relatadas, optamos por avaliar a expressão de hepcidina em células monocíticas de pacientes com ADC e ADF.

Monócitos são células facilmente obtidas do sangue periférico e sua relação com a expressão da hepcidina hepática, em pacientes com ADC, pode facilitar os estudos sobre a fisiopatologia da doença. Theurl et al. (2008) observaram que houve uma forte correlação entre a expressão de RNAm de hepcidina por monócitos e os níveis séricos de IL-6, mas não com os de ferro. Isso mostra que ela é regulada, em primeiro lugar pela inflamação, em segundo lugar pelo *status* férrico. A diminuição da expressão de ferroportina ocorreu, paralelamente, com o aumento dos níveis de RNAm de hepcidina. Nesse trabalho, a hepcidina derivada de monócitos mostrou capacidade de degradar ferroportina, *in vitro*, embora seja descrito que a maior reguladora da homeostase do ferro seja a hepcidina hepática com produção 1000 vezes maior do que a produzida por monócitos.

Peyssonnaud et al. (2006), verificaram que macrófagos são capazes de induzir o aumento da expressão de hepcidina pela via *toll-like receptor 4* (TLR4), uma via independente da IL-6, limitando a disponibilidade de ferro para microrganismos invasores no próprio microambiente do tecido infectado onde as células mielóides são recrutadas. Theurl et al. (2008) formularam a hipótese de que a formação da hepcidina por monócitos e macrófagos

resulta em significativo acúmulo desse peptídeo no ambiente inflamatório, afetando a homeostase do ferro, em um modelo autócrino e parácrino, o que contribui para a retenção de ferro observada na ADC. Este fenômeno parece ser importante em sítios inflamatórios com pobre perfusão, como o interstício, onde a hepcidina não é suficientemente abundante. Suspeita-se, então, que macrófagos, monócitos e hepatócitos devam possuir vias de sinalização e cinética de indução distintas para produção de hepcidina (PEYSSONNAUX et al., 2006; THEURL et al., 2008; YEH ;YEH; GLASS, 2004).

Em contraste com os achados descritos, nosso estudo não revelou diferenças estatísticas significativas na expressão de hepcidina entre os grupos de estudo (figura 29), bem como não houve correlação com as concentrações de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos (Tabela 10). Contudo, a expressão do RNAm de hepcidina mostrou correlação positiva com os níveis séricos de ferritina (Figura 30) mostrando que a hepcidina causa retenção de ferro dentro dessas células.

Theurl et al. (2008), constatou que em cultura de monócitos, após estímulo com LPS e IL-6, a indução da expressão de hepcidina foi muito rápida (3 horas) mas seus níveis retornaram aos níveis basais em poucas horas. Acredita-se que o RNAm da hepcidina possua baixa estabilidade ou que exista reguladores negativos da expressão do gene em monócitos, e, dessa forma, é possível que os níveis de RNAm encontrados não reflitam os níveis do produto transcrito, nos pacientes do nosso estudo.

O cDNA da hepcidina codifica um precursor de 84 aminoácidos (aas) em humanos (KULAKSIZ et al., 2004) e a preproteína é clivada, pós-tradução, duas vezes para dar origem ao peptídeo maduro (VALORE; GANZ, 2008). Na primeira clivagem, é produzida a pró-hepcidina que com 60 aas (Figura 45) (KULAKSIZ et al., 2004) e, na segunda clivagem, que ocorre no sítio furin convertase, libera o peptídeo maduro. O peptídeo maduro é rapidamente secretado da célula. O bloqueio do sítio furin convertase por inibidores químicos

específicos ou inibição da síntese de furin por siRNA bloqueia a segunda clivagem da hepcidina, mas não inibe sua liberação da célula. Dessa forma, pode ocorrer acúmulo da pró-hepcidina no meio de cultura (VALORE; GANZ, 2008). Portanto, um desbalanço entre níveis do transcrito de RNAm de hepcidina e peptídeo maduro pode ocorrer na presença de inibidores naturais de clivagem desses sítios. Lee (2008) comenta que muitos estudos têm sido feitos sobre a regulação da hepcidina em nível transcricional, contudo, deixando de lado a regulação pós-traducional.

Os achados de Huang et al. (2008) também sugerem que a hepcidina sofre regulação pós-traducional. Estes pesquisadores mostraram que os níveis de pró-hepcidina correlacionam-se com os níveis de sTfR1, sugerindo que a pró-hepcidina está relacionada com a hipoferremia e eritropoese. Os altos níveis de sTfR1 podem favorecer a conversão da pré-prohepcidina em pró-hepcidina e, ao mesmo tempo, inibir a síntese do RNAm. Em contraste, a hepcidina ativa foi associada, positivamente, com os níveis de ferritina, mas não com os níveis de sTfR, indicando que a hepcidina ativa é um marcador de sobrecarga de ferro.

A baixa estabilidade do RNAm e/ou presença de inibidores negativos da expressão do gene em monócitos e as evidências de regulação pós-traducional, são as hipóteses que podem justificar os níveis de RNAm de hepcidina encontrados no presente trabalho. Entretanto, essas hipóteses necessitam ser melhores investigadas.

A hepcidina e a ferritina respondem similarmente à inflamação e mudanças nos estoques de ferro, contudo, a hepcidina pode variar numa escala menor e, muitas condições de sobrecarga de ferro, incluindo a β -talassemia, apresentam elevados níveis de ferritina e baixos níveis de hepcidina, o que seria uma vantagem da determinação dos níveis de hepcidina no diagnóstico clínico. Outra aplicabilidade seria no diagnóstico precoce da deficiência de ferro na infância, antes mesmo da diminuição dos níveis de ferritina, reticulócitos e demais alterações nos parâmetros hematológicos. Os níveis de hepcidina poderiam ainda identificar a

necessidade de terapia de suplementação de ferro pacientes ou a falta de resposta à terapia oral. Também precisa ser avaliado se a determinação de hepcidina conseguirá melhorar a identificação de pacientes com ADC e ADF concomitantes ou pacientes com anemia de falha renal crônica que não respondem à terapia com eritropoetina (BRUGNARA, 2008).

Novos ensaios, metodologias mais específicas e sensíveis para determinação do hormônio hepcidina devem ser desenvolvidos para melhorar nosso entendimento do papel patogênico da hepcidina em várias desordens do ferro.

Ainda não sabemos se a hepcidina sofre variação fisiológica entre as diferentes faixas etárias, assim como ocorre com os níveis de citocinas inflamatórias, que estão aumentados em indivíduos geriátricos. Novos estudos elucidarão não somente os mecanismos moleculares envolvidos no processo de síntese e regulação do hormônio, mas também permitirão correlacioná-los com fatores fisiológicos e parâmetros epidemiológicos nas doenças geradas por desregulação da homeostase do ferro. Em idosos, a compreensão da interação entre envelhecimento e anemias geradas por desbalanço de citocinas pró-inflamatórias e retenção de ferro mediada por hepcidina poderão conduzir ao desenvolvimento de intervenções terapêuticas mais apropriadas para essa população.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados apresentados, pode-se concluir que:

- Os parâmetros hematológicos e bioquímicos, auxiliados pelas informações clínicas dos pacientes, possibilitaram a identificação de indivíduos idosos com ADC, ADF, dois casos de ADF e ADC concomitantes, indivíduos portadores de inflamação sem anemia e portadores de anemia de causa desconhecida;
- Os níveis séricos de ferritina estavam diminuídos nos casos de ADF, porem não atingiram os valores preconizados para diagnóstico de deficiência de ferro, sugerindo que devem ser instituídos valores de normalidade próprios para a população idosa;
- O índice receptor-ferritina não aumentou a sensibilidade diagnóstica da medida do sTfR quando utilizados os limites de normalidade citados em literatura. Isso demonstra que também para o índice receptor-ferritina devem ser instituído limites de normalidade do próprios para os idosos;
- Concentrações de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos foram maiores nos grupos ADC e Inflamação;
- As concentrações de IL-6 em sobrenadante de cultura de monócitos correlacionaram-se positivamente com os níveis de proteína C-reativa e número de leucócitos na população.;
- Os níveis de RNAm de hepcidina expressos pelos grupos Controle, ADC e ADF não foram diferentes entre si, sugerindo que os níveis do transcrito são diferentes do peptídeo maduro secretado em monócitos;
- Não houve correlação entre os níveis de IL-6 produzidos por monócitos em cultura com os níveis de expressão de RNAm de hepcidina nessas células dos pacientes do estudo;

- Os níveis de RNAm de hepcidina expressos por células monocíticas correlacionaram-se positivamente, com os níveis séricos de ferritina confirmando que a hepcidina causa retenção de ferro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALGARIN, C.; PEIRANO, P.; GARRIDO, M.; PIZARRO, F.; LOZOFF, B. Iron deficiency anemia in infancy: long-lasting effects on auditory and visual system functioning. **Pediatr Res.**, New York, v.53, p.217-223, 2003.

AGRAWAL, S.; MISRA, R.; AGGARWA, A. Anemia in rheumatoid arthritis: high prevalence of iron-deficiency anemia in Indian patients. **Rheumatol Int.**, Berlin, v.26 p, 1091–1095, 2006.

ANDRÈS, E.; FEDERICI, L.; SERRAJ, K.; KALTENBACH, G. Update of nutrient-deficiency anemia in elderly patients. **Eur J Intern Med.**, Hampshire, v.19, n.7, p.488-493, Nov/2008.

ANDREWS, N.C. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. **J. Clin. Invest.**, Boston, v.113, p.1251-1253, 2004.

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

ANDRONE, A.S.; KATZ, S.D.; LUND, L.; LAMANCA, J.; HUDAIHED, A.; HRYNIEWICZ, K.; MANCINI, D.M. Hemodilution is common in patients with advanced heart failure. **Circulation.** Dallas, v.107, p.226–229, 2003.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Heparin – central regulator of iron metabolism. **Eur. J. Haematol.**, Bucharest, v.78, p. 1-10, 2006.

BALDUCCI, L. Anemia, cancer, and aging. **Cancer Control**, Tampa, v.10, p.478–486, 2003.

BALDUCCI, L.; ERSHLER, W.B.; KRANTZ, S. Anemia in the elderly - Clinical findings and impact on health. **Crit Rev Oncol Hematol.**, Boca Raton, v. 58, p. 156–165, 2006.

BARISANI, D.; PELUCCHI, S.; MARIANI, R.; GALIMBERTI, S.; TROMBINI, P.; FUMAGALLI, D.; MENEVERI, R.; NEMETH, E.; GANZ, T.; PIPERNO, A. Heparin

and iron-related gene expression in subjects with Dysmetabolic Hepatic Iron Overload. **J Hepatol.**, Oxford, v.49, n.1, p.123-133, Jul/2008.

BARRETTO, A.C.P.; DEL CARLO C.H. Epidemiologia, fisiopatologia e fatores desencadeantes. In: BARRETTO, A.C.P. **Insuficiência cardíaca descompensada**. 1ª ed. São Paulo: Phoenix, 2007, p.7-26.

BARRON, B.A.; HOYER, J.D.; TEFFERI, A. A bone marrow report of absent stainable iron is not diagnostic of iron deficiency. **Ann Hematol.**, Berlin, v.80, p.166–169, 2001.

BERGMAN, M.; BESSLER, H.; SALMAN, H.; SIOMIN, D.; STRAUSSBERG, R.; DJALDETTI, M. In vitro cytokine production in patients with iron deficiency anemia.. **Clin Immunol.**, Orlando, v.113, n.3, p.340-344, Dec/2004.

BEGUIN, Y. Soluble transferrin receptor for the evaluation of erythropoiesis and iron status. **Clin Chim Acta.**, Amsterdam, v.329, p.9–22, 2003.

BESSLER, H.; DJALDETTI, R.; SALMAN, H.; BERGMAN, M.; DJALDETTI, M. IL-1 beta, IL-2, IL-6 and TNF-alpha production by peripheral blood mononuclear cells from patients with Parkinson's disease. **Biomed Pharmacother.**, Paris, v.5, n.3, p.141-145, Apr/1999.

BODI, V.; SANCHIS, J.; LLACER, A.; FÁCILA, L.; NÚÑEZ, J.; PELLICER, M.; BERTOMEU, V.; RUIZ, V.; CHORRO, F. J. Multimarker risk strategy for predicting 1-month and 1-year major events in non-ST-elevation acute coronary syndromes. **Am Heart J.**, St. Louis, v.149, p.268–274, 2005.

BORGES, D.R. Testes hepáticos e testes de função hepática. In: MINCIS, M. **Gastroenterologia & Hepatologia: diagnóstico e tratamento**. 3ª Ed, São Paulo, Lemos Editorial, 2002. p 565-575.

BRASIL, Lei n. 8842 de 4 de janeiro de 1994. Dispõe sobre a política nacional do idoso, cria o Conselho Nacional do Idoso e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 de janeiro de 1994, seção II.

BRIDLE, K.R.; FRAZER, D.M.; WILKINS, S.J.; DIXON, J.L.; PURDIE, D.M.; CRAWFORD, D.H.; SUBRAMANIAM, V.N.; POWELL, L.W.; ANDERSON, G.J.; RAMM, G.A. Disrupted hepcidin regulation in HFE-associated haemochromatosis and

the liver as a regulator of body iron homoeostasis. **Lancet.**, London, v.361, n.9358, p.669-673, Feb/2003.

BRUGNARA, C. Iron deficiency and erythropoiesis: new diagnostic approaches. **Clin Chem.**, Baltimore, v.49, p.1573–1578, 2003.

BRUGNARA, C. An immunoassay for human serum hepcidin at last: Ganz klar? **Blood.**, New York, v. 112, n. 1015, p. 3922-3923, nov/ 2008.

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

BRUUN, J.M.; HELGE, J.W.; RICHELSEN, B.; STALLKNECHT, B. Diet and Exercise Reduce Low-grade Inflammation and Macrophage Infiltration in Adipose Tissue but not in Skeletal Muscle in Severely Obese Subjects. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, Bethesda, v.13; p. E961–E967, 2005.

BURKE, A.; SMYTH, E.; FITZGERALD, G. A. Analgésicos-antipiréticos; farmacoterapia da gota. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. **Goodman & Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006, p.601-638.

CALADO, R. T.; ALBERTO, F. L.; FALCÃO, R. P. Metabolismo do ferro. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 219-220.

CANÇADO, R.D.; CHIATTONE, C.S. Anemia de Doença Crônica. **Rev. bras. hematol. hemoter.**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, p.127-136, 2002.

CARMEL, R. Anemia and aging: an overview of clinical, diagnostic and biological issues. **Blood Rev.**, London, v.15, p.9–18, 2001.

CARVALHO, M.C.; BARACAT, E.C. E.; SGARBIERI, V.C. Anemia Ferropriva e Anemia de Doença Crônica: Distúrbios do Metabolismo de Ferro. **SAN**, Campinas, v.13, n.2, p.54-63, 2006,

CARVALHO, J.A.M.; GARCIA, R.A. O envelhecimento da população brasileira: um enfoque demográfico. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.1, n.3, p.725-733, mai-jun, 2003.

CESARI, M.; PAHOR, M.; LAURETANI, F.; PENNINX, B.W.; BARTALI, B.; RUSSO, R.; CHERUBINI, A.; WOODMAN, R.; GURALNIK, S.B.J.M.; FERRUCCI, F. Bone density and hemoglobin levels in older persons: results from the InCHIANTI study. **Osteoporos Int.**, London, v.16, p.691–699, 2005.

CHAE, C.U.; LEE, R.T.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M. Blood pressure and inflammation in apparently healthy men. **Hypertension**, Dallas, v. 38, p. 399 –403, 2001.

CHEN, C.F.; CHENG, C.H. Regulation of cellular metabolism and cytokines by the medicinal herb feverfew in the human monocytic THP-1 cells. **Evid Based Complement Alternat Med.**, Oxford, v. 6, n.1, p. 1-8, Mar, 2009.

CHEW, D.P.; BHATT, D.L.; ROBBINS, M.A.; PENN, M.S.; SCHNEIDER, J.P.; LAUER, M.S.; TOPOL, E.J.; ELLIS, S.E. Incremental prognostic value of elevated baseline C-reactive protein among established markers of risk in percutaneous coronary intervention. **Circulation**, Dallas, v.104, p. 992, 2001.

CHOI, J.W. Sensitivity, specificity, and predictive value of serum soluble transferrin receptor at different stages of iron deficiency. **Ann Clin Lab Sci.**, Philadelphia, v.35, n.4, p.435-9, Aut/ 2005.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal Biochem.**, New York, v.162, n.1, p. 156-159, Apr /1987.

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

COOK, J.D.; FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S. The quantitative assessment of body iron. **Blood.**, New York, v. 101, p. 3359– 3363, 2003.

CUZZOCREA, S. Role of nitric oxide and reactive oxygens species in arthritis. **Curr. Pharm. Des.**, Schiphol, v.12, p.3551-3570, 2006.

DANIS, V. A.; MILLINGTON, M. V.; HYLAND, J.; GRENNAN, D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation an relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. **Clin Exp Immunol.**, Oxford, v.99, p.303-310, 1995.

DE CAESTECKER, M. The transforming growth factor- β superfamily of receptors. **Cytokine Growth Factor Rev.**, Cambridge, v.15, p. 1–11, 2004.

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

EKIZ, C.; AGAOGLU, L.; KARAKAS, Z.; GUREL, N.; YALCIN, I. The effect of iron deficiency anemia on the function of the immune system. **Hematol J.**, Hampshire, v.5, n.7, p. 579-583, 2005.

ERSHLER, W.B.; KELLER, E.T. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. **Annu Rev Med.**, Palo Alto, v.51, p.245–270, 2000.

ERSHLER, W.B. Biological interactions of aging and anemia: a focus on cytokines. **J Am Geriatr Soc.**, New York, v. 51, n. 3, S18-S21, Mar/2003.

ERSHLER, W.B.; SHENG, S.; MCKELVEY, J.; ARTZ, A.S.; DENDULURI, N.; TECSON, J.; TAUB, D.D.; BRANT, L.J.; FERRUCCI, L.; LONGO, D.L. Serum erythropoietin and aging: a longitudinal analysis. **J Am Geriatr Soc.**, v. 53, p. 1360–1365, 2005.

ESTELLA, J. Orientación diagnóstica de las anemias en pediatría. **Bol Pediatr.**, Asturias, v. 46, p. 328-333, 2006.

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

EZEKOWITZ, J.A.; MCALISTER, F.A.; ARMSTRONG, P.W. Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12,065 patients with new-onset heart failure. **Circulation.**, Dallas, v.107, p. 223–225, 2003.

FALCÃO, R.P.; CALADO, R.T. Anemia ferropriva. In: ZAGO, M. A.; FALCÃO, R. P.; PASQUINI, R. **Hematologia: fundamentos e prática**. 1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005, p. 223-229.

FALZACAPPA, M.V.V.; MUCKENTHALER, M.U. Hepcidin: iron-hormone and anti-microbial peptide. **Gene.**, Amsterdam, v.30, n.364, p.37-44, 2005.

FLANAGAN, J.M.; TRUKSA, J.; PENG, H.; LEE, P.; BEUTLER, E. In vivo imaging of hepcidin promoter stimulation by iron and inflammation. **Blood Cells Mol Dis.**, v.38, n.3, p.253-257, 2007.

FELKER, G. M.; ADAMS, K. F.; GATTIS, W. A.; O'CONNOR C. M. Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure. **Blood Cells Mol. Dis.**, La Jolla, v. 44, n. 5, p. 959-966, 2004.

FERRUCCI, L.; GURALNIK, J.M.; WOODMAN, R.C.; BANDINELLI, S.; LAURETANI, F.; CORSI, A.M.; CHAVES, P.H.; ERSHLER, W.B.; LONGO, D.L. Proinflammatory state and circulating erythropoietin in persons with and without anemia. **Am. J. Med.**, New York, v.118, p.1288, 2005.

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

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

FRANCISCO, G.; HERNÁNDEZ, C.; SIMÓ, R. Serum markers of vascular inflammation in dyslipemia. **Clin Chim Acta.**, Amsterdam, v.15, v.369, n.1, p.1-16, Jul/2006.

FRIBERG, D.; BRYANT, J.; SHANNON, W.; WHITESIDE, T.L. In vitro cytokine production by normal human peripheral blood mononuclear cells as a measure of immunocompetence or the state of activation. **Clin Diagn Lab Immunol.**, Washington, v.1, n.3, p.261-268, May/1994.

FUHRMAN, M.P.; CHARNEY, P.; MUELLER, C.M. Hepatic proteins and nutrition assessment. **J Am Diet Assoc.**, Chicago, v.104, p.1258-1264, 2004.

FUJITA, N.; SUGIMOTO, R.; TAKEO, M.; URAWA, N.; MIFUJI, R.; TANAKA, H.; KOBAYASHI, Y.; IWASA, M.; WATANABE, S.; ADACHI, Y.; KAITO, M. Hepcidin expression in the liver: relatively low level in patients with chronic hepatitis C. **Mol Med.**, Cambridge, v.13, n.1-2, p. 97-104, 2007.

FYHRQUIST, F.; KARPPINEN, K.; HONKANEN, T.; SAIJONMAA, O.; ROSENLOF, K. High serum erythropoietin levels are normalized during treatment of congestive heart failure with enalapril. **J Intern Med.**, Oxford, v. 226, n. 4, p.257- 260, 1989.

GABRILOVE, J. Anemia and the elderly: clinical considerations. **Best Pract Res Clin Haematol.**, London, v.18, n.3, p. 417-422, 2005.

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

GANZ, T. Molecular pathogenesis of anemia of chronic disease. **Pediatr Blood Cancer**, John Wiley, v.46, p.554-557, 2006a.

GANZ, T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, Washington, p.29-35, 2006b.

GANZ, T. Molecular control of iron transport. **J Am Soc Nephrol.**, Baltimore, v. 18, p.394-400, 2007.

GANZ, T.; NEMETH, E. Regulation of iron distribution in mammals. **Biochim. Biophys. Acta.**, Amsterdam, v.1763, p.690-699, 2006.

GANZ, T.; OLBINA, G.; GIRELLI, D.; NEMETH, E.; WESTERMAN, M. Immunoassay for human serum hepcidin. **Blood**, New York, v. 112, n. 10, p. 4292-7, nov/2008.

GEHRKE, S.G.; KULAKSIZ, H.; HERRMANN, T.; RIEDEL, H.D.; BENTS, K.; VELTKAMP, C.; STREMMEL, W. Expression of hepcidin in hereditary hemochromatosis: evidence for a regulation in response to the serum transferrin saturation and to non-transferrin-bound iron. **Blood**., New York, v.102, n.1, p.371-6, Jul/2003.

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

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

GURALNIK, J.M.; EISENSTAEDT, R.S.; FERRUCCI, L.; KLEIN, H.G.; WOODMAN, R.C. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. **Blood**., New York, v. 104, p.2263-8, 2004.

GURALNIK, J.M.; EISENSTAEDT, R.S.; SCHRIER, S.L.; PICOZZI, V.J. Anemia in the elderly: a public health crisis in hematology. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, Washington, p.528-532, 2005.

HAAS JD, BROWNLIE T. Iron deficiency and reduced work capacity: a critical review of the research to determine a causal relationship. **J Nutr.**, Philadelphia, p. 131, 2001.

HALTERMAN, J.S.; KACZOROWSKI, J.M.; ALIGNE, C.A.; AUINGER, P.; SZILAGYI, P.G. Iron deficiency and cognitive achievement among school-aged children and adolescents in the United States. **Pediatrics.**, Springfield, v. 107, p. 1381-1386, 2001.

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

HILLEGE, H.L.M. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. **Circulation**., Dallas, v. 102, p. 203–210, 2000.

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

HORWICH, T.B.; FONAROW, G.C.; HAMILTON, M.A.; MACLELLAN, W.R.; BORENSTEIN, J. Anemia is associated with worse symptoms, greater impairment in functional capacity and a significant increase in mortality in patients with advanced heart failure. **J Am Coll Cardiol.**, New York, v. 39, p. 1780–1786, 2002.

HTOO, M.S.; KOFKOFF, R.L.; FREEDMAN, M.L. Erythrocyte parameters in the elderly: an argument against new geriatric normal values. **J Am Geriatr Soc**, New York, v.27, n.12, p.547–551, 1979.

HUANG, X.; FUNG, E.T.; YIP, C.; ZELENIUCH-JACQUOTTE, A. Serum prohepcidin is associated with soluble transferrin receptor-1 but not ferritin in healthy postmenopausal women. **Blood Cells Mol Dis.**, La Jolla, v.41, n.3, p.265-269, Nov-Dec/2008.

HUGMAN, A. Hepcidin: an important new regulator of iron homeostasis. **Clin. Lab. Haem**, Wameral, v.28, p.75-83, 2006.

IZAKS, G.J.; WESTENDORP, R.G.J.; KNOOK, D.L. The definition of anemia in older persons. **JAMA**., Chicago, v. 1714, p. 714-717, 1999.

JAMES, W. P. T.; HAY A. M. Albumin metabolism: effect of the nutritional state and the dietary protein intake. **J Clin Invest.**, New Haven, v.47, n.9, p.1958-1972, 1968.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Imunidade inata. In: JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M.

Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença. 5^a ed. São Paulo: Arned, 2002, p.55-111.

JASON, J.; ARCHIBALD, L.K.; NWANYANWU, O.C.; BELL, M.; JENSEN, R.J.; GUNTER, E.; BUCHANAN, I.; LARNED, J.; KAZEMBE, P.N.; DOBBIE, H.; JARVIS, W.R. The effects of iron deficiency on lymphocyte cytokine production and activation: preservation of hepatic iron but not at all cost. **Clin Exp Immunol.**, v.126, n.3, p.466-473, 2001/Dec.

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

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

JOOSTEN, E.; PELEMANS, W.; HIELE, M.; NOYEN, J.; VERHAEGHE, R.; BOOGAERTS, M.A. Prevalence and causes of anaemia in a geriatric hospitalized population. **Gerontology**, Basel, v.38, p.111–117, 1992.

KAMENETZ, Y.; BELOOSESKY, Y.; ZELTZER, C.; GOTLIEB, D.; MAGAZANIK, A.; FISHMAN, P.; GRINBLAT, J. Relationship between routine hematological parameters, serum IL-3, IL-6 and erythropoietin and mild anemia and degree of function in the elderly, **Aging.**, Milano, v. 10, p. 32–38, 1998.

KAMIMURA, M.A.; DRAIBE, S.A.; DALBONI, M.A.; CENDOROGLO, M.; AVESANI, C.M.; MANFREDI, S.R.; CANZIANI, M.E.; CUPPARI, L. Serum and cellular interleukin-6 in haemodialysis patients: relationship with energy expenditure. **Nephrol Dial Transplant.**, Oxford, v.22, n.3, p.839-844, Mar/2007.

KANIA, D.M.; BINKLEY, N.; CHECOVICH, M.; HAVIGHURST, T.; SCHILLING, M.; ERSHLER, W.B. Elevated plasma levels of interleukin-6 in postmenopausal women do not correlate with bone density. **J Am Geriatr Soc.**, New York, v.43, p.236–239, 1995.

KATIAL, R.K.; SACHANANDANI, D.; PINNEY, C.; LIEBERMAN, M.M. Cytokine production in cell culture by peripheral blood mononuclear cells from immunocompetent hosts. **Clin Diagn Lab Immunol.**, Washington, v.5, n.1, p.78-81, Jan/1998.

KEMNA, E.; TJALSMA, H.; LAARAKKERS, C.; NEMETH, E.; WILLEMS, H.; SWINKELS, D. Novel urine hepcidin assay by mass spectrometry. **Blood.**, New York, n.106, p.3268-3270, 2005a.

KEMNA, E.; PICKKERS, P.; NEMETH, E.; VAN DER HOEVEN, H.; SWINKELS, D. Timecourse analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS, **Blood**, v.106, n.5, p.1864–1866, 2005b.

KEMNA, E.H.; TJALSMA, H.; PODUST, V.N.; SWINKELS, D.W. Mass spectrometry-based hepcidin measurements in serum and urine: analytical aspects and clinical implications. **Clin Chem.**, Baltimore, v.53, p.620-628, 2007.

KILLIP, S.; BENNETT, J.; CHAMBERS, M. D. Iron Deficiency Anemia. **Am Fam Physician.**, Kansas City, v. 75, n.5, p. 671-678, 2007.

KOLIARAKI, V.; MARINOU, M.; VASSILAKOPOULOS, T.P.; VAVOURAKIS, E.; TSOCHATZIS, E.; PANGALIS, GA.; PAPATHEODORIDIS, G.; STAMOULAKATOU, A.; SWINKELS, D.W.; PAPANIKOLAOU, G.; MAMALAKI, A. A novel immunological assay for hepcidin quantification in human serum. **Plos One.**, San Francisco, v.4, n.2, p.e4581, 2009.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. **Dicionário Terapêutico Guanabara.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 14.4-14.5; p. 21.1-21.11.

KOSBOROD, M.; SMITH, G.L.; RADFORD, M.J.; FOODY, J.M.; KRUMHOLZ, H.M. The prognostic importance of anemia in patients with heart failure. **Am J Med.**, New York, v.114, p.112–9, 2003.

KOULAOUZIDIS, A.; COTTIER, R.; BHAT, S.; SAID, E.; LINAKER, B.D.; SAEED, A.A. A ferritin level >50 µg/L is frequently consistent with iron deficiency. **Eur J Intern Med.**, Basingstoke, v. 20, n. 2, p. 168-170, Mar/2009.

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

KULAKSIZ, H.; GEHRKE, S.G.; JANETZKO, A.; ROST, D.; BRUCKNER, T.; KALLINOWSKI, B.; STREMMEL, W. Prohepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. **Gut**, London, v.53, p.735-743, 2004.

LEE, P. Commentary to: "Post-translational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin," by Erika Valore and Tomas Ganz. **Blood Cells Mol Dis**, La Jolla, v.40, n.1, p.139-40, Jan-Feb/2008.

LIN, L.; VALORE, E.V.; NEMETH, E.; GOODNOUGH, J.B.; GABAYAN, V.; GANZ, T. Iron transferrin regulates hepcidin synthesis in primary hepatocyte culture through hemojuvelin and BMP2/4. **Blood**, New York, v.110, p.2182-2189, 2007.

LINDMARK, E.; DIDERHOLM, E.; WALLENTIN, L.; SIEGBAHN, A. Relationship between interleukin-6 and mortality in patients with unstable coronary artery disease: effects of an early invasive or non-invasive strategy. **JAMA**, Chicago, v. 286, p. 2107–13, 2001.

LIPSCHITZ, D.A.; MITCHELL, C.O.; THOMPSON, C. The anemia of senescence. **Am J Hematol**; New York, v.11, p.1, p.47–54, 1981.

LORENZI, T.F. Fisiologia das células do sangue e da hemostasia. In: LORENZI, T.F. **Manual de hematologia: propedêutica e clínica**. 2ª ed. São Paulo: Medsi, 1999, p. 49-216.

LOU, D.Q.; NICOLAS, G.; LESBORDES, J.C.; VIATTE, L.; GRIMBER, G.; SZAJNERT, M.F.; KAHN, A.; VAULONT, S. Functional differences between hepcidin 1 and 2 in transgenic mice. **Blood**, New York, v. 103, n. 7, p. 2816–2821, 2004.

LUUKKONEN, S.; PUNNONEN, K. Serum pro-hepcidin concentrations and their responses to oral iron supplementation in healthy subjects manifest considerable inter-individual variation. **Clin Chem Lab Med**, Berlin, v.44, p.11, p.1361-1362, 2006.

MACKENZIE, B.; GARRICK, M.D. Iron Imports: II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, Bethesda, v. 289, p. G981–G986, 2005.

MACKENZIE, B.; UJWAL, M.L.; CHANG, M.H.; ROMERO, M.F.; HEDIGER, M.A. Divalent metal-ion transporter DMT1 mediates both H⁺-coupled Fe²⁺ transport and uncoupled fluxes. **Pflugers Arch.**, Berlin, v.451, p.544–558, 2006.

MAGGIO, M.; GURALNIK, J.M.; LONGO, D.L.; FERRUCCI, L. Interleukin-6 in aging and chronic disease: a magnificent pathway. **J.Gerontol., A, Biol. Sci.Med. Sci.**, Washington, v. 61, p. 575–584, 2006.

MALISZKO, J.; MALYSZKO, J.S.; PAWLAK, K.; MYSLIWIEC, M. Hecidin, an acute phase protein and a marker of inflammation in kidney transplant recipients with and without coronary artery disease. **Transplant. Proc.**, New York, v.38, p. 2895-2898, 2006.

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

MARKOVIC, M.; MAJKIC-SINGH, N.; IGNJATOVIC, S.; SINGH, S. Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation. **Int J Lab Hematol**, Oxford, v. 29, p. 341–346, 2007.

MAZER, S.P.; RABBANI, L.E. Evidence for C-reactive protein's (CRP) role in vascular disease: atherothrombosis, immunoregulation and CRP. **J Thromb Thrombolysis.**, Dordrecht, v.17, p.95–105, 2004.

MCKANE, W.R.; KHOSLA, S.; PETERSON, J.M.; EGAN, K.; RIGGS, B.L. Circulating levels of cytokines that modulate bone resorption: Effects of age and menopause in women. **J Bone Miner Res.**, New York, v.9, p.1313–1318, 1994.

MEANS, R.T.Jr. Hecidin and anaemia. **Blood Rev.**, London, v. 18, n. 4, p. 219 – 225, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Governo do Brasil, 2004. **Anemia**. Disponível em <http://bvsmis.saude.gov.br/html/pt/dicas/69anemia.html>. Acesso em 24 jan. 2008.

MODAN, M; HALKIN, H; ALMOG, S; LUSKY, A; ESHKOL, A; SHEFI, M; SHITRIT, A; FUCHS, Z. Hyperinsulinemia: a link between hypertension obesity and glucose intolerance. **J Clin Invest.**, New Haven, v.75, n.3, p.809–817,1985.

MORENO, I. Epidemiologia, fisiopatologia e fatores desencadeantes. In: BARRETTO, A.C.P. **Insuficiência cardíaca descompensada**. 1ª ed. São Paulo: Phoenix, 2007, p.109-120.

MOZAFFARIAN, D.; NYE, R.; LEVY, W.C. Anemia predicts mortality in severe heart failure: the Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation (PRAISE). **J Am Coll Cardiol.**, New York, v.41, p. 1933–1939, 2003.

MUNOZ, C.; CARLET, J.; FITTING, C.; MISSET, B.; BLÉRIOT, J.P.; CAVAILLON, J.M. Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis. **J Clin Invest.**, New Haven, v.88, n.5, p.1747-1754, Nov/1991.

MURPHY, A.T.; WITCHER, D.R.; LUAN, P.; WROBLEWSKI, V.J. Quantitation of hepcidin from human and mouse serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Blood.**, New York, v.110, p.1048-1054, 2007.

MUTZE, S.; HEBLING, U.; STREMMEL, W.; WANS, J.; ARNHOLD, J.; PANTOPOULOS, K.; MUELLER, S. Myeloperoxidase-derived hypochlorous acid antagonizes the oxidative stress-mediated activation of iron regulatory protein 1. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.278, n.42, p.542-549, 2003.

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

NAPPO, F.; ESPOSITO, K.; CIOFFI, M.; GIUGLIANO, G.; MOLINARI, A.M.; PAOLISSO, G.; MARFELLA, R.; GIUGLIANO, D. Postprandial endothelial activation in healthy subjects and in type 2 diabetic patients: role of fat and carbohydrate meals. **J Am Coll Cardiol.**, New York, v. 39, p. 1145–1150, 2002.

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

NEMETH, E.; RIVERA, S.; GABAYAN, V.; KELLER, C.; TAUDORF, S.; PEDERSEN, B. K.; GANZ, T. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. **J. Clin. Invest.**, Los Angeles, v.113, n.9, p.1251-1253, 2004.

NEMETH, E.; ROETTO, A.; GAROZZO, G.; GANZ, T.; CAMASCHELLA, C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. **Blood**, New York, v.105, n.4, p.1803–1806, 2005.

NEMETH, E.; PREZA, G.C.; JUNG, C.L.; KAPLAN, J.; WARING, A.J.; GANZ, T. The N-terminus of hepcidin is essential for its interaction with ferroportin: structure-function study. **Blood**, New York, v.107, n.1, p.328-333, 2006.

NICOLAS, G.; BENNOUN, M.; DEVAUX, I.; BEAUMONT, C.; GRANDCHAMP, B.; KAHN, A.; VAULONT, S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice, **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, Washington, v. 98, n. 15, p. 8780–8785, 2001.

NIEKEN, J.; MULDER, N.H.; BUTER, J.; VELLENGA, E.; LIMBURG, P.C.; PIERS, D.A.; DE VRIES, E.G. Recombinant human interleukin-6 induces a rapid and reversible anemia in cancer patients. **Blood**, New York, v.86, p.900–905, 1995.

NILSSON-EHLE, H.; JAGENBURG, R.; LANDAHL, S.; SVANBORG, A. Blood haemoglobin declines in the elderly: implications for reference intervals from age 70 to 88. **Eur J Haematol**, Copenhagen, v.65, p.297–305, 2000.

OCKENE, I.S.; MATTHEWS, C.E.; RIFAI, N.; RIDKER, P.M.; REED, G.; STANEK, E. Variability and classification accuracy of serial high-sensitivity C-reactive protein measurements in healthy adults. **Clin Chem.**, Washington, v.49, n.1, p.444-450, Jan/2003.

ODEMIS, E.; KOCA, C.; KARADAG, A.; CATAL, F.; AYDIN, M.; TURKAY, S.; YIGITOGLU, R. Nitric oxide affects serum ferritin levels in children with iron deficiency. **Pediatr Hematol Oncol.**, Hagerstown, v.24, n.3, p.189-94, Apr-May/2007.
OLIVARES, M.; HERTRAMPF, E.; CAPURRO, M.T.; WEGNER, D. Prevalence of anemia in elderly subjects living at home: role of micronutrient deficiency and inflammation. **Eur J Clin Nutr.**, London, v. 54, p.834–9, 2000.

OKONKO, D.O.; ANKER, S.D. Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms. **J Card Fail.**, Naperville, v.10, p. S5–S9, 2004.

OKONKO, D.O.; VELDHUISEN, D.J.V.; POOLE-WILSON, P.A.; ANKER, S.D. Anaemia of chronic disease in chronic heart failure: the emerging evidence. **Eur Heart J.**, London, v.26, p. 2213–2214, 2005.

OPPENHEIM, J. J.; RUSCETTI, F. W. Citocinas. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; Parslow, T. G. **Imunologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 113-130.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Envelhecimento ativo: uma política de saúde**, 2005. Brasília. Organização Pan Americana de saúde, 2005, 62p, 2005

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

PAPANIKOLAOU, G.; TZILIANOS, M.; CHRISTAKIS, J.I.; BOGDANOS, D.; TSIMIRIKA, K.; MACFARLANE, J.; GOLDBERG, Y.P.; SAKELLAROPOULOS, N.; GANZ, T.; NEMETH, E. Hpcidin in iron overload disorders. **Blood**, New York, v.105, n.10, p.4103–4105, 2005.

PARK, C.H.; VALORE, E.V.; WARING, A.J.; GANZ, T. Hpcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. 276, n. 11, p. 7806–7810, 2001.

PARSLOW, T.G.; BANTON, D. Imunidade Inata. In: STITES, D. P.; TERR, A. I.; Parslow, T. G. **Imunologia Médica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000, p. 113-130.

PENNINX, B.W.; PAHOR, M.; CESARI, M.; CORSI, A.M.; WOODMAN, R.C.; BANDINELLI, S.; GURALNIK, J.M.; FERRUCCI, L. Anemia is associated with disability and decreased physical performance and muscle strength in the elderly. **J Am Geriatr Soc.**, New York, n.52, p. 719–724, 2004.

PEPYS, M.B., HIRSCHFIELD, G.M. C-reactive protein: a critical update. **J. Clin. Invest.**, New Haven, n. 111, p. 1805–1812, 2003.

PERRONE, R.D.; MADIAS, N.E.; LEVEY, A.S. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. **Clin Chem.**, Baltimore, v.39, n.7, p.1547, 1993.

PEYSSONNAUX, C.; ZINKERNAGEL, AS.; DATTA, V.; LAUTH, X.; JOHNSON, R.S.; NIZET, V. TLR4-dependent hepcidin expression by myeloid cells in response to bacterial pathogens. **Blood.**, New York, v.107, n.9, p.3727–3732, May/2006.

PICCIRILLO, L.J.; GONCALVES, M.F.R.; CLEMENTE, E.L.S.; GOMES, M.B.. Marcadores de inflamação em pacientes com diabetes *mellitus* tipo 1. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v. 48, n. 2, p. 253-260, 2004.

PIETRANGÉLO, A. Hereditary hemochromatosis. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1763, p.700–710, 2006.

PIETRANGELO, A.; TRAUTWEIN, C. Mechanism of disease: the role of hepcidin in iron homeostasis – implications for hemochromatosis and other disorders. **Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol**, Modena, v.1, n.1, p.39-45, 2004.

PIGEON C.; ILYIN G.; COURSELAUD B.; LEROYER P.; TURLIN B.; BRISSOT P.; LORÉAL O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. **J Biol Chem.**, Baltimore, v.276, n.7811-7819,2001.

PONKA, P. Cellular iron metabolism. **Kidney Int.**, New York, p. 55, v. 69, p. 2–11, 1999.

PRICE, E.A. Aging and erythropoiesis: current state of knowledge, **Blood Cells Mol. Diseases.**, La Jolla, v.41, p. 158–165 2008.

RAJA, K. B.; LATUNDE DADA, G. O.; PETERS, T. J.; MCKIE A. T.; SIMPSOM R. J. Role of interleukin-6 in hypoxic regulation of intestinal iron absorption. **Br J Haematol.**, Oxford, v.131, n. 5, p. 656-662, 2005.

RAMOS, L.R.; VERAS, R.P.; KALACHE, A. Envelhecimento populacional: uma realidade brasileira. **Rev. Saúde públ.**, São Paulo, v.21, p.211-24, 1987.

RAPPAPORT, S.I. Anemia ferropriva. In: RAPPAPORT, S.I. **Introdução à Hematologia**. 2ª ed. São Paulo: Roca, 2000, p.30-41.

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

RIFAI, N., RIDKER, P.M. High-sensitivity C-reactive protein: a novel and promising marker of coronary heart disease. **Clin. Chem.**, Baltimore, v. 47, p. 403, 2001.

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

ROBERTS, W.L.; MOULTON, L.; LAW, T.C.; FARROW, G.; COOPER-ANDERSON, M.; SAVORY, J.; RIFAI, N. Evaluation of nine automated high-sensitivity C-reactive protein methods: implications for clinical and epidemiological applications. Part 2. **Clin Chem.**, v.47, n.9, p.1743, Washington, Sep/2001.

ROE, M.A.; SPINKS, C.; HEATH, A.L.; HARVEY, L.J.; FOXALL, R.; WIMPERIS, J.; WOLF, C.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Serum prohepcidin concentration: no association with iron absorption in healthy men; and no relationship with iron status in men carrying HFE mutations, hereditary haemochromatosis patients undergoing phlebotomy treatment, or pregnant women. **Br J Nutr.**, Wallingford, v.97, p.544-549, 2007.

ROE, M.A.; COLLINGS, R.; DAINTY, J.R.; SWINKELS, D.W.; FAIRWEATHER-TAIT, S.J. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. **Am J Clin Nutr.**, Bethesda, v.89, n.4, p.1088-1091, Apr/2009.

RYFFEL, B.; KAMMILLER, M.; ROBISON, R.; MYER, L. Pathology induced by interleukin-6. **Toxicol Lett.**, Amsterdam, v.64/65, p. 311-319, 1992.

SANCEAU, J; WIJDENES, J; REVEL, M; WIETZERBIN, J. IL-6 and IL-6 receptor modulation by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha in human monocytic cell line (THP-1): priming effect of IFN-gamma. **J Immunol.**, Bethesda, v.147, n.8, p. 2630-2637, 1991.

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

SHARMA, V.R.; BRANNON, M.A.; CARLOSS, E.A. Effect of omeprazole on oral iron replacement in patients with iron deficiency anemia. **SMJ**, Birmingham, v.97, n.9, p.887-889, Sep/2004.

SILVA, R.C. Importância da avaliação da função tireoidiana em pacientes com diabetes mellitus. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo, v.49, n.2, p.180-182, 2005.

SILVERBERG, D.S.; WEXLER, D.; BLUM, M.; KEREN, G.; SHEPS, D.; LEIBOVITCH, E.; BROSH, D.; LANIADO, S.; SCHWARTZ, D.; YACHNIN, T.; SHAPIRA, I.; GAVISH, D.; BARUCH, R.; KOIFMAN, B.; KAPLAN, C.; STEINBRUCH, S.; IAINA, A. The use of subcutaneous erythropoietin and intravenous iron for the treatment of the anemia of severe, resistant congestive heart failure improves cardiac and renal function and functional cardiac class, and markedly reduces hospitalizations. **J Am Coll Cardiol.**, New York, v.35, p.1737-1744, 2000.

SILVERBERG, D.S. Outcomes of anaemia management in renal insufficiency and cardiac disease. **Nephrol Dial Transplant.**, Berlin, p. 8, v. 2, p. 7-12, 2003.

SPECTOR, T.D.; HART, D.J.; NANDRA, D.; DOYLE, D.V.; MACKILLOP, N.; GALLIMORE, J.R.; PEPYS, M. Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. **Arthritis Rheum.**, Atlanta, v.40, p.723-727, 1997.

SPELETAS, M.; KIOUMI, A.; LOULES, G.; HYTIROGLOU, P.; TSITOURIDIS, J.; CHRISTAKIS, J.; GERMENIS, A.E. Analysis of SLC40A1 gene at the mRNA level reveals rapidly the causative mutations in patients with hereditary hemochromatosis type IV. **Blood Cells Mol Dis**, La Jolla, v. 40, n. 3, p. 353-359, May-Jun/2008.

STARKIE R. L.; ROLLAND J.; ANGUS D. J.; ANDERSON M. J.; FEBBRAIO M. A. Circulating monocytes are not the source of elevations in plasma IL-6 and TNF- α levels after prolonged running. **Am J Physiol Cell Physiol**, Bethesda, v. 49, n.4, p. C769-C774, 2001.

SUN, W.H.; BINKLEY, N.; BIDWELL, D.W.; ERSHLER, W.B. The influence of recombinant human interleukin-6 on blood and immune parameters in middle-aged and old rhesus monkeys. **Lymphokine Cytokine Res.**, New York, v.12, n.449–455, 1993.

SUOMINEN, P.; PUNNONEM, K.; RAJAMAKI, A.; IRJALA, K. Serum Transferrin Receptor and transferrin receptor ferritin index can be used to detect true and functional iron deficiency in rheumatoid arthritis patients with anemia. **Arthritis Rheuma.**, New York, v.43, n.5, p. 1016-1020, 1998.

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

SWINKELS, D.W.; DRENTH, J.P.H. Hepcidin in the management of patients with mild non-hemochromatotic iron overload: fact or fiction? **J Hepatol**, Amsterdam, v.49, p.680–685, 2008.

TANNER, H.; MOSCHOVITIS, G.; KUSTER, G.M.; HULLIN, R.; PFIFFNER, D.; HESS, OM.; MOHACSI, P. The prevalence of anemia in chronic heart failure. **Int J Cardiol.**, Amsterdam, v.86, p.115–121, 2002.

TANNO, T.; BHANU, N.V.; ONEAL, P.A.; GOH, S.; STAKER, L.P.; TERRY, Y.; MORONEY, J.W.; REED, C.H.; LUBAN, N.L.C.; 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- 1101, sep/2007.

TOMOSUGI, N.; KAWABATA, H.; WAKATABE, R.; HIGUCHI, M.; YAMAYA, H.; UMEHARA, H.; ISHIKAWA, I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. **Blood**, New York, v.108, n.4, p. 1381–1387, 2006.

THEURL, I.; MATTLE, V.; SEIFERT, M.; MARIANI, M.; MARTH, C.; WEISS, G. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. **Blood.**, New York, v.107, n.10, p.4142-4148, May/2006.

THEURL I.; THEURL M.; SEIFERT M.; MAIR S.; NAIR M.; RUMPOLD H.; ZOLLER H.; BELLMANN-WEILER R.; NIEDEREGGER H.; TALASZ H.; WEISS G. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. **Blood**, New York, v.11, n.4, p.2392-2399, Feb/2008.

TERROVITIS, J.; ANASTASIOU-NANA, M.; ALEXOPOULOS, G.; TSOLAKIS, E.; MARGARI, Z.; DRAKOS, S.; TSAGALOU, E.; PAPAZOGLU, P.; EFENTAKIS, S.; NANAS, J. Prevalence and Prognostic Significance of Anemia in Patients With Congestive Heart Failure Treated With Standard vs High Doses of Enalapril. **J. Heart Lung Transplant.**, St. Louis, v.25, n.3, p. 333-338, 2006.

THOMAS, C.; THOMAS, L. Biochemical markers and hematologic indices in diagnosis of functional iron deficiency. **Clin Chem.**, Baltimore, v. 48, p.1066–1076, 2002.

TOMOSUGI, N.; KAWABATA, H.; WAKATABE, R.; HIGUCHI, M.; YAMAYA, H.; UMEHARA, H.; ISHIKAWA, I. Detection of serum hepcidin in renal failure and inflammation by using ProteinChip System. **Blood.**, New York, n.108, p.1381-1387, 2006.

TRACY, R.P; PSATY, B.M.; MACY, E.; BOVILL, E.G.; CUSHMAN, M.; CORNELL E.S.; KULLER, L.H. Lifetime smoking exposure affects the association of C-reactive protein with cardiovascular disease risk factors and subclinical disease in healthy elderly subjects. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Dallas, v.17, p.2167–2176, 1997.

TRUKSA, J.; PENG, H.; LEE, P.; BEUTLER, E. Different regulatory elements are required for response of hepcidin to interleukin-6 and bone morphogenetic proteins 4 and 9. **Br J Haematol.**, Oxford, v.139, n.1, p.138-147, 2007.

VALORE, E.V.; GANZ, T. Posttranslational processing of hepcidin in human hepatocytes is mediated by the prohormone convertase furin. **Blood Cells Mol Dis.**, La Jolla, v.40, n.1, p.132-138, Jan-Feb/2008.

VERDON, F.; BURNAND, B.; STUBI, C.L.; BONARD, C.; GRAFF, M.; MICHAUD, A.; Bischoff, T.; Vevey, M.; STUDER, J.P.; HERZIG, L.; CHAPUIS, C.; TISSOT, J.; PÉCOUD, A.; FAVRAT, B. Iron supplementation for unexplained fatigue in non-

anaemic women: double blind randomised placebo controlled trial. **BMJ.**, London, v.326, p.1124, 2003.

VERMA, S.; WANG, C.H.; LI, S.H.; DUMONT, A.S.; FEDAK, P.W.; BADIWALA, M.V.; Dhillon, B.; Weisel, R.D.; Li, R.K.; Mickle, D.A.G.; Stewart, D.J. A self-fulfilling prophecy: C-reactive protein attenuates nitric oxide production and inhibits angiogenesis. **Circulation**, Dallas, n.106, p. 913, 2002.

VERMA, S.; SZMITKO, P.E.; YEH, E.T. C-reactive protein: structure affects function. **Circulation**, Dallas, v. 109, n.16, p. 1914-1917, Apr 27/2004.

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

WILLIS, C.; MORRIS, J.M.; DANIS, V.; GALLERY, E.D. Cytokine production by peripheral blood monocytes during the normal human ovulatory menstrual cycle. **Hum Reprod.**, Oxford, v.18, n.6, p.1173-1178, Jun/2003.

WOODMAN, R.; FERRUCCI, L.; GURALNIK, J. Anemia in older adults. **Curr Opin Hematol.**, Philadelphia, v. 12, p.123–128, 2005.

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

WRIGHTING, D.M.; ANDREWS, N.C. Interleukin-6 induces hepcidin expression through 2STAT3. **Blood**, New York, v.1, n.108 (9), p.3204-3209, 2006.

YEH, E.T.; WILLERSON, J.T. Coming of age of C-reactive protein: using inflammation markers in cardiology. **Circulation**, Dallas, v.107, p.370, 2003.

YEH, K.Y.; YEH, M. ; GLASS, J. Hepcidin regulation of ferroportin 1 expression in the liver and intestine of the rat. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, Bethesda, v.286, p.G385-G394, 2004.

YEN, M.H.; BHATT, D.L.; CHEW, D.P.; HARRINGTON, R.A.; NEWBY, L.K.; ARDISSINO, D.; VAN DE WERF, F.; WHITE, J.A.; MOLITERNO, D.J.; TOPOL, E.J.

Association between admission white blood cell count and one-year mortality in patients with acute coronary syndromes. **Am J Med.**, New York, v. 115, p.318–321, 2003.

YUDKIN, J.S.; STEHOUWER, C.D.; EMEIS, J.J.; COPPACK, S.W. C-Reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue? **Arterioscler Thromb Vasc Biol.**, Dallas, v.19, p.972–978, 1999.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, São Paulo, v.21, n.6, p.787-793, 1998.

APÊNDICES

Apêndice A – Medianas dos parâmetros hematológicos, níveis séricos da proteína C-reativa, produção de IL-6 e expressão de hepcidina dos grupos de estudo e diferenças significativas

Grupos Parâmetros	Grupo Controle (n=13)	Grupo ADC (n=12)	Grupo Inflamação (n=7)	Grupo Anemia (n=7)	Grupo ADF (n=10)	Diferença estatística significativa (p<0,05)
Eritrócitos - Mulheres (milhões/mm³)	4.48	4.01	4.37	4.15	4.16	-
Hemoglobina - Mulheres (g/dL)	12.7	11.0	12.8	11.3	11.3	Controle x ADC ** Controle x Anemia * Controle x ADF * ADC x Inflamação ** Inflamação x Anemia * Inflamação x ADF *
Índice hematócrito - Mulheres (%)	41.5	37.5	41.3	36.8	38.0	Controle x ADC ** Controle x Anemia * ADC x Inflamação ** Inflamação x Anemia *
Ferritina - Mulheres (ng/mL)	115.0	84.7	127.5	91.6	24.3	Controle x ADF * ADC x ADF * Inflamação x ADF ** Anemia x ADF *
VCM (fL)	96.0	90.0	93.0	91.0	92.0	-
HCM (pg)	29.0	27.5	29.0	27.0	27.5	Controle x ADC *
CHCM (g/dL)	31.0	29.5	31.0	30.0	29.0	-
RDW (%)	13.6	14.5	14.4	14.6	14.6	-
Leucócitos (/mm³)	5900	6000	7100	5100	4600	Inflamação x ADF *
Neutrófilos (%)	61	60	63	61	59	-
Monócitos (%)	5	5	4	3	4	-
Plaquetas (/mm³)	178000	195000	186000	178000	188000	-
sTfR (nmol/L)	16.01	20.48	21.00	16.67	25.94	Controle x ADF **
Índice sTfR/ log ferritina	0.67	0.82	0.76	0.75	1.57	Controle x ADF *** Anemia x ADF *
Proteína C- reativa (mg/L)	0.20	3.86	5.00	0.70	1.54	Controle x ADC *** Controle x Inflamação *** ADC x Anemia * ADC x ADF * Inflamação x Anemia * Inflamação x ADF *
IL-6 (ng/mL)	17.60	41.54	39.45	8.67	15.96	ADC x Anemia *
Hepcidina (2^{-ΔΔCt})	1.000	0.707	-	-	0.683	-

* Representa significância estatística com valores de p<0.05; ** Representa significância estatística com valores de p<0.01; *** Representa significância estatística com valores de p<0.001

Apêndice B – Correlações entre os diversos parâmetros avaliados na população estudada

	Parâmetros correlacionados		Valores de “r” e “p”
População total	IL-6 (ng/mL)	Proteína C-reativa (mg/dL)	R= 0,4237 e P= 0,0012
	IL-6 (ng/mL)	Leucócitos (/mm ³)	R= 0,2776 e P= 0,0267
	Hepcidina (2 ^{-ΔΔCt})	Ferritina (ng/mL)	R= 0,4668 e P= 0,0164
	RDW (%)	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= -0,2453 e P= 0,0447
	RDW (%)	Hemoglobina (g/dL)	R= -0,4031 e P= 0,0020
	RDW (%)	Hematócrito (%)	R= -0,3735 e P= 0,0041
	Leucócitos (/mm ³)	Proteína C-reativa (mg/dL)	R= 0,3012 e P= 0,0177
Grupo controle	CHCM (g/dL)	Ferritina (ng/mL)	R= 0,5469 e P= 0,0265
	Eritrócitos (milhões/mm ³) (<i>mulheres</i>)	IL-6 (ng/mL) (<i>mulheres</i>)	R= -0,8286 e P= 0,0292
Grupo ADC	Ferritina (ng/mL)	Proteína C-reativa (mg/dL)	R= 0,6200 e P= 0,0158
	Índice sTfR/log ferritina	Proteína C-reativa (mg/dL)	R= -0,5664 e P= 0,0274
	Ferritina (ng/mL) (<i>mulheres</i>)	Proteína C-reativa (mg/dL) (<i>mulheres</i>)	R= 0,6242 e P= 0,0269
	Ferritina (ng/mL) (<i>mulheres</i>)	Hematócrito (%) (<i>mulheres</i>)	R= -0,5758 e P= 0,0408
Grupo Inflamação	RDW (%)	sTfR (nmol/L)	R= -0,7568 e P= 0,0331
Grupo Anemia	Ferritina (ng/mL)	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= 0,8829 e P= 0,0062
	Ferritina (ng/mL)	Hemoglobina (g/dL)	R= 0,8214 e P= 0,0171
	Ferritina (ng/mL)	Hematócrito (%)	R= 0,9643 e P= 0,0014
	sTfR (nmol/L)	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= -0,7027 e P= 0,0440
	Índice sTfR/log ferritina	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= -0,7027 e P= 0,0440
Grupo ADF	RDW (%)	Hemoglobina (g/dL)	R= -0,6056 e P= 0,0318
	RDW (%)	Hematócrito (%)	R= -0,5951 e P= 0,0348
	sTfR (nmol/L)	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= -0,6121 e P= 0,0062
	Índice sTfR/log ferritina	Eritrócitos (milhões/mm ³)	R= -0,5879 e P= 0,0369
	Índice sTfR/log ferritina	Hematócrito (%)	R= -0,5714 e P= 0,0422