

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**JANUÁRIA FONSECA MATOS**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM NOVO ÍNDICE NA  
DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANEMIA FERROPRIVA E  
TALASSEMIAS MENORES**

Belo Horizonte - MG  
2012

**JANUÁRIA FONSECA MATOS**

**AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM NOVO ÍNDICE NA  
DIFERENCIAÇÃO ENTRE ANEMIA FERROPRIVA E  
TALASSEMIAS MENORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Carvalho  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes Borges

Belo Horizonte - MG  
2012

**Colaboradores:** Estatístico Ricardo Vilela de Castro

Farmacêutica-Bioquímica Ms. Mônica de F. Ribeiro Ferreira

Farmacêutica-Bioquímica Rachel Versiani Bressane Stubbert

Prof. Dr. José Roberto de Faria

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula S. M. Fernandes

### **Linha de Pesquisa**

Desenvolvimento e Aplicações Analíticas em Química Biológica e Toxicologia

### **Área de conhecimento**

4.01.01.05-3 - Hematologia

### **Instituições Participantes:**

Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG)

Faculdade de Farmácia/ Departamento de Análises Clínicas – UFMG

Hospital das Clínicas - UFMG

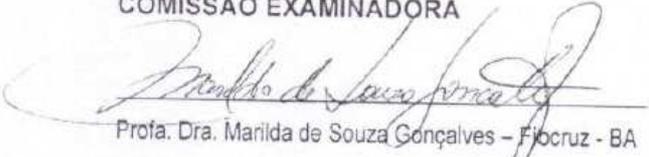
## FOLHA DE APROVAÇÃO

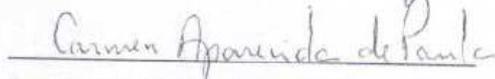
JANUÁRIA FONSECA MATOS

"AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE UM NOVO ÍNDICE NA DIFERENCIAÇÃO  
ENTRE ANEMIA FERROPRIVA E TALASSEMIAS MENORES"

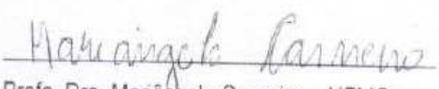
Tese, como requisito parcial para obter o grau de  
Doutor em Ciências Farmacêuticas, submetida ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da  
Universidade Federal de Minas Gerais e aprovada  
em vinte e cinco de junho de 2012.

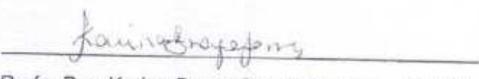
### COMISSÃO EXAMINADORA

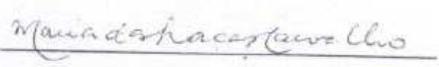
  
Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves - Flocruz - BA

  
Profa. Dra. Carmem Aparecida de Paula - UFOP

  
Profa. Dra. Rosa Malena Delbone de Faria - UFMG

  
Profa. Dra. Mariângela Carneiro - UFMG

  
Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges - UFMG

  
Profa. Dra. Maria das Graças Carvalho - UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, Pedro e Maria Lúcia,  
meus maiores exemplos de dignidade,  
honestidade e perseverança.

Ao Wendel pelo carinho e  
apoio contínuos.

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

Às minhas afilhadas Rafaela, Lívia e Emanuela  
por sempre me trazerem alegria.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, que estando presente em minha vida, me proporcionou perseverança e força para a conclusão de mais uma etapa de minha vida profissional;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria das Graças Carvalho, pela brilhante orientação do projeto, pela amizade e ensinamentos profissionais e pessoais e, por despertar em mim, a paixão por Hematologia;

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karina Braga Gomes Borges pela dedicação à co-orientação do projeto e pelo incentivo, paciência e carinho;

Ao estatístico Ricardo Vilela pelo empenho e excelente trabalho de desenvolvimento do Novo Índice;

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

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

Ao Prof. José Roberto pela imprescindível colaboração na seleção dos pacientes;

À professora e mestre Flávia Komatsuzaki pela contribuição na análise estatística dos resultados;

À Geralda de Fátima Guerra Lages pela amizade e também pelo apoio técnico;

A todos os alunos de iniciação científica e estagiários que auxiliaram de alguma forma no projeto, especialmente à Roberta Coeli Neves pela extrema dedicação e boa vontade constantes na realização das tarefas e, hoje, pela grande amizade;

Aos amigos da pós graduação, Letícia, Cláudia, Vívian e Flávia pela contribuição, apoio e incentivo que certamente facilitaram a realização deste trabalho;

Ao Instituto Federal Minas Gerais - Campus Ouro Preto, na pessoa do Dr. Arthur Versiani, pela flexibilização de meu horário de trabalho e incentivo à realização do doutorado;

Aos meus colegas e amigos de trabalho do Instituto Federal Minas Gerais - Campus Ouro Preto pelo apoio nos momentos de dificuldade;

A todos os pacientes, sem os quais não seria possível a concretização do estudo;

Aos meus pais, que nunca mediram esforços para a realização de meus propósitos e que sempre estiveram presentes, principalmente nos momentos de dificuldade, me apoiando;

Ao Wendel pelo carinho, apoio e paciência;

Às minhas irmãs, Júnia e Jordânia, pelo constante incentivo e carinho;

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

“A vida é feita de momentos!  
Momentos os quais temos que passar, bons ou não,  
para o nosso próprio aprendizado, por algum motivo.  
Nunca se esquecendo do mais importante:  
*Nada nessa vida é por acaso.*  
Absolutamente nada.  
Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte,  
da melhor forma possível...  
A vida nem sempre segue o nosso querer, mas...  
Ela é perfeita naquilo que tem que ser”  
*(Chico Xavier)*

## RESUMO

As anemias microcíticas e hipocrômicas mais comuns em nosso meio são a anemia ferropriva, as talassemias e a anemia de doença crônica. O diagnóstico diferencial destas anemias é clinicamente importante uma vez que possuem diferentes patogênese, tratamento e prognóstico. Atualmente, o diagnóstico destas doenças é realizado através dos exames denominados padrão-ouro, muitas vezes inacessíveis a uma população menos favorecida. Em contrapartida, várias fórmulas descritas na literatura e obtidas a partir de parâmetros do hemograma foram desenvolvidas com o intuito de discriminar a anemia ferropriva das talassemias menores. Este estudo foi delineado com objetivo de avaliar o desempenho de um Novo Índice e, de outras nove fórmulas, na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores, utilizando métodos hematológicos convencionais e moleculares como referência; bem como diagnosticar por meio destes métodos, os casos de  $\alpha$ -talassemia nos pacientes envolvidos no estudo. A amostra foi constituída por dois grupos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas e no Hospital Governador Israel Pinheiro de Belo Horizonte. Foram coletadas amostras de sangue em EDTA e obtidos os resultados do hemograma e ferritina de 197 pacientes do Hospital Governador Israel Pinheiro. No Hospital das Clínicas foram coletadas amostras de sangue em EDTA e obtidos os dados clínicos e laboratoriais de 30 pacientes por meio dos seus prontuários. As amostras de sangue foram utilizadas para investigar a presença de sete mutações deletoriais e uma mutação não deletorial causadoras de  $\alpha$ -talassemia. Os dados laboratoriais permitiram que os pacientes fossem classificados como portadores de anemia ferropriva e talassemias menores. Utilizando os parâmetros do hemograma, foram calculados os valores de nove índices. Para verificar a acurácia destes índices na diferenciação de anemia ferropriva e talassemias menores foram determinados os valores de sensibilidade, especificidade, eficiência, índice de Youden e área sob a curva ROC. Para a verificação da concordância dos resultados obtidos através da aplicação dos índices com os resultados dos exames padrão-ouro foi calculado o coeficiente *kappa*. Foi observado que, dentre as nove fórmulas testadas, o Índice de Green & King, o Índice do RDW e o Novo Índice apresentaram excelente desempenho na discriminação

entre anemia ferropriva e talassemias menores e poderiam ser utilizados como ferramenta de *screening* destas anemias microcíticas. Em relação à frequência de  $\alpha$ -talassemia em nosso meio, foi observado que 20,3% dos 227 pacientes envolvidos neste estudo foram carreadores da deleção de 3.7 Kb. Desta forma, a investigação em amostras de sangue de pacientes com anemia microcítica e hipocrômica, valendo-se de métodos moleculares, revelou uma elevada frequência de  $\alpha$ -talassemia nos grupos de pacientes dos dois hospitais públicos do Estado de Minas Gerais, indicando a necessidade de introdução de tais métodos para diagnosticar corretamente casos específicos.

**Palavras-chave:** anemia ferropriva, talassemias menores, Novo Índice, índices discriminativos.

## ABSTRACT

The most common microcytic and hypochromic anemias in our population are iron deficiency anemia, thalassemias and anemia of chronic disease. The differential diagnosis of these anemias is clinically important because they show different pathogenesis, treatment and prognosis. Currently, the diagnosis of these diseases is carried out through tests considered gold standard, often inaccessible to a less favored population. In contrast, several formulas described in the literature and obtained from the blood count parameters were developed in order to discriminate iron deficiency anemia from thalassemia minor. This study was designed to evaluate the performance of a New Index, besides nine other formulas in the differentiation between iron deficiency anemia and thalassemia minor, using conventional hematology and molecular methods as reference, as well as to diagnose, through these methods, the cases of  $\alpha$ -thalassemia in patients of the study. The sample consisted of two groups of patients treated at the both Hospital das Clinicas and Hospital Governador Israel Pinheiro in Belo Horizonte, Minas Gerais. Blood samples were collected in EDTA from 197 patients and obtained results for blood count and ferritin in the Hospital Governador Israel Pinheiro. For the 30 patients recruited at the Hospital das Clinicas blood samples were collected in EDTA and the data obtained through clinical and laboratory records. Blood samples were used to investigate the presence of seven deletional mutations and a non- deletional mutation causing  $\alpha$ -thalassemia trait. Laboratory data allowed the patients' classification as having iron deficiency anemia and thalassemia minor. Using the parameters extracted from a simple blood count there were calculated values of nine indices. To verify the accuracy of these indices in differentiating iron deficiency anemia and thalassemia minor were determined sensitivity, specificity, efficiency, Youden index and area under ROC curve. To check the consistency of the results obtained through application of the indices with the results of gold standard tests, *kappa* coefficient was calculated. It was observed that among the nine tested formulas, Green and King Index, the New Index and RDW Index showed excellent performance in discriminating between

iron deficiency anemia and thalassemia minor and could be used as a tool for screening of these microcytic anemias. A study on the frequency of  $\alpha$ -thalassemia in our population it was observed that 20,3% of the 227 patients enrolled in the present study were carriers of the deletion 3.7 Kb. So, the investigation in blood samples from patients with microcytic and hypochromic anemia, by molecular methods, revealed a high frequency of the  $\alpha$ -thalassemia in groups of patients from two public hospitals of Minas Gerais state, indicating the necessity of introducing such methods to correctly diagnose specific cases.

**Key-words:** iron deficiency anemia, thalassemias minor, New Index, discriminative indices.

## LISTA DE FIGURAS

1 - O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. ....	22
2- Deleções causadoras de $\alpha^+$ -talassemia.....	41
3- Mecanismo de ocorrência das deleções $-\alpha^{3.7}$ e $-\alpha^{4.2}$ .....	42
4- Deleções no grupamento $\alpha$ -globínico causadoras de $\alpha^0$ -talassemia.....	44
5- A distribuição global das $\alpha$ -talassemias. $\alpha^T$ - formas não delecionais de $\alpha$ -talassemia .....	46
6- Curvas ROC para o Índice de Green & King (IGK) e o Novo Índice. ....	53
7- Representação esquemática do grupamento do gene $\alpha$ globínico indicando a extensão de sete deleções e as posições relativas dos <i>primers</i> . ....	62
8- Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, dos produtos de PCR Multiplex para identificação das mutações 3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, FIL e THAI. ....	67
9- Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, dos produtos de PCR após a digestão com a enzima <i>HphI</i> para a identificação da mutação não delecional <i>HphI</i> .....	67
10 - Valores de Hemácia e CHCM dos pacientes do banco de dados com 185 pacientes, de acordo com o tipo de anemia, bem como a reta de discriminação do Novo Índice. ....	137
11 - Curva ROC do índice RDWI, do Índice de Green & King e do Novo Índice. ....	137

## LISTA DE TABELAS

- 1 Sequências dos *primers* utilizados para a detecção das mutações delecionais e não delecionais da  $\alpha$ -talassemia..... 62
- 2 Fórmulas e valores de *cut-off* para nove índices de discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor. .... 63
- 3 Caracterização dos pacientes portadores de anemia ferropriva (AF total) e seus subgrupos: somente anemia ferropriva (AF) e anemia ferropriva + talassemias menores (AF + Tal) atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e talassemias menores (Tal) atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC), com relação à média de idade (idades mínima e máxima) e ao sexo. .... 70
- 4 Parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de anemia ferropriva (AF), anemia ferropriva e talassemias menores (AF + Tal) atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e apenas talassemias menores (Tal) atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC). .... 71
- 5 Pacientes (em números absolutos e valores percentuais) corretamente diagnosticados pelos índices testados..... 73
- 6 Sensibilidade, especificidade, eficiência e Índice de Youden de nove índices na discriminação entre anemia ferropriva (AF) e talassemia menor (Tal)..... 76
- 7 Valores de áreas sob a curva ROC e coeficiente *kappa* para as funções discriminantes testadas. .... 78
- 8 Avaliação do número de pacientes carreadores das mutações 3.7 e HphI associadas à  $\alpha$ -talassemia pesquisada nos pacientes portadores de anemia ferropriva atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e nos portadores de talassemia menor atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC). .... 68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADC	Anemia de doença crônica
ALAS-2	Delta aminolevulínico sintetase 2
ATP	Trifosfato de adenosina
BMP	Proteína morfogenética óssea
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CPE	Células precursoras eritróides
CTLF	Capacidade de ligação total do ferro
DcytB	Ferriredutase citocromo B duodenal
DMT-1	Transportador de metal divalente-1
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPO	Eritropoetina
GATA-1	Fator de transcrição codificado pelo gene GATA-1
Hb	Hemoglobina
HbA	Hemoglobina A
HbA <sub>2</sub>	Hemoglobina A <sub>2</sub>
HbCS	Hemoglobina Constant Spring
HbF	Hemoglobina fetal
HbH	Hemoglobina H
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HCP1	Proteína transportadora do heme-1
HFE	Proteína codificada pelo gene HFE (da hemocromatose)
HJV	Hemojuvelina
HVR	Região hipervariável
IE	Índice de Ehsani
IGK	Índice de Green & King
IM	Índice de Mentzer
IPSEMG	Instituto de Previdência Social do Estado de Minas Gerais
IR	Índice de Ricerca

IRDW	Índice do RDW
IRE	Elemento responsivo ao ferro
IREG1	Ferroportina 1
IRP	Proteína regulatória do ferro
IS	Índice de Sirdah
ISR	Índice de Srivastava
IST	Índice de saturação de transferrina
IVS-I	Primeiro intron
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NI	Novo Índice
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RDW	Índice de anisocitose eritrocitária
ROC	<i>Receiver Operator Characteristic</i>
SL	Índice de Shine & Lal
SMF	Sistema mononuclear fagocitário
Steap 3	Ferriredutase codificada pelo gene Steap 3
sTfR	Receptor sérico de transferrina
Tf	Transferrina
TFIIH	Fator de transcrição TFIIH
TfR	Receptor de transferrina
UTR	Região não traduzida
VCM	Volume corpuscular médio
ZPP	Zinco protoporfirina

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>1.1 Metabolismo do ferro</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1.1 Absorção, transporte, captação e regulação do ferro</b> .....	<b>19</b>
<b>1.2 Anemia ferropriva</b> .....	<b>25</b>
<b>1.3 Talassemias</b> .....	<b>31</b>
<b>1.3.1 <math>\alpha</math>-Talassemia</b> .....	<b>32</b>
<b>1.3.2 <math>\beta</math>-Talassemia</b> .....	<b>34</b>
<b>1.3.3 Epidemiologia das talassemias</b> .....	<b>37</b>
<b>1.3.4 Aspectos moleculares das talassemias</b> .....	<b>38</b>
<b>1.3.4.1 Alfa-talassemia</b> .....	<b>38</b>
<b>1.3.4.1.1 Deleções causadoras de <math>\alpha^+</math>-talassemia ou <math>\alpha</math>-talassemia-2</b> .....	<b>39</b>
<b>1.3.4.1.2 Deleções causadoras de <math>\alpha^0</math>-talassemia ou <math>\alpha</math>-talassemia-1</b> .....	<b>42</b>
<b>1.3.4.1.3 Formas não delecionais</b> .....	<b>44</b>
<b>1.3.4.2 <math>\beta</math>-talassemia</b> .....	<b>47</b>
<b>1.4 Anemia da doença crônica</b> .....	<b>48</b>
<b>1.5 Índices para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores</b> .....	<b>49</b>
<b>1.5.1 Novo Índice</b> .....	<b>51</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>55</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>58</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>58</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>58</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
<b>4.1 Aspectos éticos</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2 Casuística</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1)</b> .....	<b>59</b>
<b>4.2.2 Pacientes do IPSEMG (Grupo 2)</b> .....	<b>60</b>
<b>4.3 Extração de DNA a partir de sangue total</b> .....	<b>60</b>
<b>4.4 Protocolo para estudo das mutações</b> .....	<b>61</b>
<b>4.5 Aplicação de índices discriminativos entre anemia ferropriva e talassemias menores</b> .....	<b>63</b>

4.5 Análise Estatística.....	64
5 RESULTADOS.....	66
5.1 Avaliação das mutações causadoras de $\alpha$ -talassemia .....	66
5.1.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1) .....	66
5.1.2 Pacientes IPSEMG (Grupo 2).....	67
5.2 Caracterização dos pacientes .....	69
5.2.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1) .....	69
5.2.2 Pacientes do IPSEMG (Grupo 2) .....	69
5.3 Análise de parâmetros hematimétricos.....	70
5.4 Análise de vários índices na discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor .....	72
6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	79
6.1 Considerações gerais .....	79
6.2 Avaliação das mutações causadoras de $\alpha$ -talassemia .....	80
6.3 Caracterização dos pacientes .....	83
6.4 Parâmetros do hemograma .....	84
6.5 Potencial aplicação de índices na discriminação de anemias microcíticas e hipocrômicas .....	89
6.6 Potencial aplicação de índices em casos de concomitância de anemias microcíticas.....	98
6.7 Limitações deste estudo.....	98
7 CONCLUSÕES .....	100
PERSPECTIVAS.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	103
ANEXO A - Desenvolvimento do Novo Índice (NI).....	123
ANEXO B - Parecer COEP - UFMG.....	140
ANEXO C - Parecer Hospital das Clínicas - UFMG .....	141
ANEXO D - Parecer Hospital Governador Israel Pinheiro - IPSEMG.....	142
APÊNDICE A - Ficha clínica.....	144
APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	146
APÊNDICE C - Protocolo para extração de DNA .....	147

<b>APÊNDICE D - Protocolo para pesquisa das mutações deleticionais .....</b>	<b>148</b>
<b>APÊNDICE E - Protocolo para pesquisa da mutação não deletional HphI .....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE F - Artigo aceito para publicação .....</b>	<b>150</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As anemias microcíticas e hipocrômicas são consideradas estados que acarretam diminuição da hemoglobina circulante e que cursam com prejuízo (dificuldade ou diminuição) da síntese de hemoglobina nas células precursoras eritróides (CPE) na medula óssea, gerando eritrócitos de pequeno tamanho e com baixa concentração de hemoglobina. As principais anemias microcíticas e hipocrômicas incluem a anemia ferropriva, as talassemias, a anemia de doença crônica (ADC) e anemia sideroblástica (OLIVEIRA & NETO, 2004). Dentre as talassemias, ressaltam-se as  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemias como sendo as mais frequentes e de maior importância clínica.

Devido à migração populacional, o Brasil recebeu um expressivo contingente de indivíduos oriundos de áreas com grande número de portadores de distúrbio relacionado às  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemias. Em virtude das dificuldades inerentes ao processo de identificação dos portadores principalmente de  $\alpha$ -talassemia, foi objeto desse estudo, o diagnóstico dessas talassemias em suas formas menores ou heterozigotas, com ênfase na  $\alpha$ -talassemia, enfocando os métodos convencionais e moleculares de diagnóstico, suas limitações, vantagens e desvantagens. Ainda na tentativa de facilitar e aperfeiçoar o diagnóstico das talassemias menores, foram testadas várias fórmulas constantes na literatura que utilizam parâmetros do hemograma e que foram desenvolvidas para diferenciar anemia ferropriva das talassemias menores (MENTZER, 1973; SRIVASTAVA, 1973; SHINE & LAL, 1977; RICERCA *et al.*, 1987; GREEN & KING, 1989; JAYABOSE *et al.*, 1999; EHSANI *et al.*, 2005; MATOS, 2007; SIRDAH *et al.*, 2008). Neste contexto, uma nova fórmula, o Novo Índice (NI), desenvolvida em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007), também foi testada com intuito de proceder à sua validação, escopo principal deste estudo.

À luz do exposto acima, segue-se a fundamentação teórica das bases deste estudo enfocando-se, inicialmente, as anemias microcíticas e hipocrômicas mais frequentes em nosso meio.

## **1.1 Metabolismo do ferro**

O ferro é um nutriente essencial para todos os organismos (SHARP & SRAI, 2007), sendo um componente primordial da hemoglobina, mioglobina, citocromos e de muitas enzimas envolvidas em reações de oxi-redução e metabolismo energético, incluindo aquelas da cadeia respiratória mitocondrial e redutases ribonucleotídicas envolvidas na síntese de desoxirribonucleotídeos (ATANASIU *et al.*, 2007). Contudo, o excesso de ferro no organismo é extremamente prejudicial: o ferro livre promove a geração de radicais de oxigênio por catalizar a reação de Fenton na qual o  $\text{Fe}^{2+}$  reage com peróxido de hidrogênio levando à formação de radicais hidroxil e ânions superóxido. Estes radicais altamente reativos podem causar danos a membranas lipídicas, proteínas e ácidos nucleicos (FALZACAPPA & MUCKENTHALER, 2005). Portanto, para manter o equilíbrio do ferro no organismo, alcançando níveis adequados e evitando seu excesso que provoca toxicidade, vários mecanismos estreitamente regulados controlam a absorção, utilização, estoque, reciclagem e o seu balanço sistêmico e celular.

O ferro se mantém conservado, em grande parte pela reciclagem de ferro da hemoglobina de eritrócitos senescentes. A maioria do ferro no plasma é destinada à eritropoese medular. A perda diária do ferro em indivíduos adultos saudáveis é pequena (1-2 mg) e corresponde às perdas sanguíneas mínimas e à constante esfoliação de células epiteliais do trato urinário e gastrointestinal, pele e cabelos. A absorção diária do ferro da dieta supre tais perdas (NEMETH & GANZ, 2006; SHARP & SRAI, 2007). Desta forma, no homem e em outros mamíferos faltam mecanismos efetivos para excretar ferro e, por este motivo, o único meio de manter o equilíbrio do ferro é controlar sua absorção (ATANASIU *et al.*, 2007; GROTTTO, 2010).

### **1.1.1 Absorção, transporte, captação e regulação do ferro**

O ferro disponível na dieta se encontra principalmente na forma inorgânica ou não heme ou na forma heme (MIRET *et al.*, 2003; SIAH *et al.*, 2006). Sua absorção ocorre quase inteiramente no duodeno e jejuno proximal através das células absortivas

intestinais (enterócitos) (EDISON *et al.*, 2008). Inicialmente ocorre a captação do ferro do lúmen intestinal para o interior do enterócito através da membrana apical (FRAZER & ANDERSON, 2005). O ferro não heme da dieta ocorre principalmente na sua forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ), que por não ser biodisponível, deve passar por um processo de redução à forma  $\text{Fe}^{2+}$  para ser transportado através do epitélio intestinal (SIAH *et al.*, 2006). A redução do ferro férrico para o estado ferroso ocorre na superfície apical dos enterócitos através de uma ferriredutase citocromo-b duodenal, a DcytB (MCKIE *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2009). Uma vez reduzido ao estado ferroso, o  $\text{Fe}^{2+}$ , assim como outros metais de transição divalentes, é transportado através da membrana apical do enterócito através do transportador de metal divalente (DMT1) (**Figura 1**) (FLEMING, 2005).

Animais que possuem defeitos em DMT1 têm uma absorção diminuída do ferro da dieta sugerindo que DMT1 apresenta grande importância para a entrada de ferro no organismo (ANDREWS, 1999). Mutações de DMT1 foram identificadas em humanos portadores de anemia congênita. A primeira mutação descrita em humanos foi encontrada no estado homozigoto em uma mulher apresentando grave anemia microcítica e hipocrômica acompanhada por acúmulo de ferro hepático (MIMS *et al.*, 2005). Posteriormente, Iolascon *et al.* (2006) identificaram duas novas mutações em DMT-1 ocorridas em dupla heterozigose em uma criança que apresentava severa anemia microcítica e hipocrômica congênita e sobrecarga de ferro no fígado. O início precoce do acúmulo de ferro hepático indicou que, como em modelos animais, DMT-1 não é necessário para a captação de ferro no fígado, enquanto os dados hematológicos desta paciente ao nascimento, indicadores de grave anemia microcítica e hipocrômica, confirmaram o papel essencial deste transportador na eritropoese. Beaumont *et al.*, em 2006, relataram o terceiro caso de anemia microcítica e hipocrômica congênita devido à mutações em DMT-1. Estes pesquisadores identificaram duas novas mutações ocorridas em dupla heterozigose em uma paciente, associadas à anemia congênita e progressiva sobrecarga de ferro hepático.

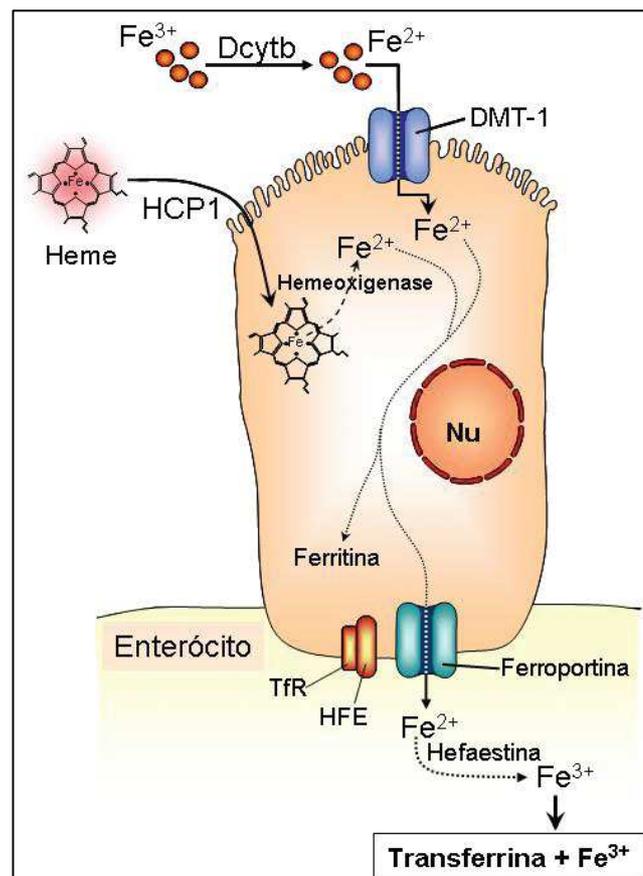
Uma vez internalizado, o ferro proveniente da dieta é utilizado nos processos metabólicos celulares, outra parte é estocada na forma de ferritina enquanto uma terceira parte é transferida pela membrana basolateral do enterócito para o plasma

**(Figura 1)**. O ferro retido como ferritina dentro do enterócito é excretado nas fezes quando ocorre a descamação epitelial dos enterócitos senescentes dois a três dias depois (FLEMING, 2005; WESSLING-RESNICK, 2006; ANDREWS & SCHMIDT, 2007; ZHANG & ENNS, 2009). Dentro do enterócito o transporte do ferro entre a membrana apical e a membrana basolateral é pouco compreendido; uma hipótese seria a ligação do ferro à moléculas chaperones que o manteriam solúvel (FRAZER & ANDERSON, 2005; EDISON *et al.*, 2008).

O heme, uma molécula formada por um anel de protoporfirina ligado ao ferro, é resultante do catabolismo da hemoglobina e mioglobina e parece ser transportado intacto do lúmen intestinal para o enterócito sendo internalizado através de um receptor recentemente identificado, a proteína transportadora do heme 1 (HCP1). O complexo heme-HCP1 é internalizado por endocitose mediada por receptor. O ferro no estado ferroso é liberado do heme intracelularmente pela heme oxigenase encontrada na superfície do retículo endoplasmático. Acredita-se que após sua dissociação do heme, o ferro liberado seja estocado ou exportado do enterócito através da membrana basolateral de maneira similar ao ferro iônico **(Figura 1)** (SHAYEGHI *et al.*, 2005; SIAH *et al.*, 2006; ANDREWS & SCHMIDT, 2007; EDISON *et al.*, 2008).

A transferência do ferro no estado ferroso do enterócito para o espaço intersticial é mediada pela ferroportina 1, também conhecida como IREG1, uma proteína exportadora de ferro em diferentes tipos celulares: enterócitos, macrófagos, hepatócitos e trofoblastos da placenta. A ferroportina é, provavelmente, a única proteína exportadora de ferro conhecida em vertebrados (GANZ, 2005; ANDREWS & SCHMIDT, 2007; ZHANG & ENNS, 2009). De maneira semelhante a DMT1, a ferroportina transporta íons  $\text{Fe}^{2+}$  sendo necessária a ação posterior da ferroxidase homóloga da ceruloplasmina, a hefestina, pois o  $\text{Fe}^{2+}$  deve ser oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  para ser transportado pelas proteínas plasmáticas (FLEMING, 2005; NEMETH & GANZ, 2006). Uma vez no meio extracelular, o ferro na forma férrica se liga rapidamente e com grande afinidade à transferrina, proteína transportadora de ferro no soro, e levado para a circulação **(Figura 1)** (DUNN *et al.*, 2007). A quantidade de ferro absorvida pelos enterócitos é influenciada por vários fatores, entre estes as variações nas reservas corporais e na taxa de eritropoese, hipóxia, inflamação e gravidez resultando em alterações na

expressão duodenal das mais importantes moléculas transportadoras do ferro dos enterócitos particularmente DMT1, Dcytb e ferroportina 1, a nível de RNA mensageiro (mRNA) e também no nível protéico (FRAZER & ANDERSON, 2005). A proteína HFE também regula a absorção de ferro intestinal uma vez que interage com o receptor da transferrina (TfR) e detecta o seu grau de saturação (**Figura 1**) (GROTTO, 2008).



**Figura 1** - O enterócito e as proteínas envolvidas na absorção do ferro. Dcytb: ferreredutase; DMT-1: transportador de metal divalente-1; HCP1: proteína transportadora do heme-1; Nu: núcleo; HFE: proteína da hemocromatose; TfR: receptor da transferrina (extraído de GROTTO, 2008).

A captação do ferro inicia-se pela ligação da transferrina diférrica a seu receptor presente na superfície da maioria das células, mas altamente expresso nos precursores eritróides. A afinidade do TfR à transferrina diférrica parece mediada pela proteína HFE codificada pelo gene da hemocromatose. O complexo Tf-TfR-HFE é internalizado por endocitose. Dentro do endossomo, sob condições de baixo pH, o ferro se dissocia da

transferrina. O complexo apoTf-TfR-HFE retorna à superfície celular e a apoTf é liberada do TfR. Com o auxílio do DMT1 o ferro do endossoma alcança o citoplasma. Contudo, antes de ser transportado ao citoplasma, o ferro que se encontra na forma férrica é reduzido a forma ferrosa através de uma ferriredutase recentemente identificada Steap 3 (COOK, 2005; OHGAMI *et al.*, 2005; ATANASIU *et al.*, 2007; GROTTTO, 2010).

Além do TfR citado anteriormente, há também o TfR2 que, apesar da semelhança com a TfR, é expresso predominantemente no fígado. TfR2 possui atividade de captação do ferro mas, contrariamente a TfR, tem afinidade muito baixa pela transferrina diférrica (KAWABATA *et al.*, 1999; GROTTTO, 2010).

Os eritrócitos senescentes ou danificados são retirados da circulação pelos macrófagos do sistema mononuclear fagocitário (SMF) onde o ferro é liberado da hemoglobina podendo seguir dois caminhos: ser estocado como ferritina intracelular ou voltar para a circulação como ferro ligado à transferrina. Aproximadamente 22 mg de ferro são liberados pelo SRE diariamente, o que corresponde à quantidade de ferro utilizada pela medula óssea na produção de células sanguíneas vermelhas neste mesmo período de tempo (ANDERSON *et al.*, 2007).

A concentração e fluxo do ferro são regulados a nível celular e sistêmico. No meio intracelular a regulação ocorre através de duas proteínas regulatórias do ferro IRP1 e IRP2 (HENTZE *et al.*, 2004; GROTTTO, 2010). Quando o ferro citoplasmático está em baixa concentração, IRPs se ligam aos elementos responsivos ao ferro (IRE), sequências no mRNA de proteínas reguladas pelo ferro. De acordo com a posição do IRE (região não traduzida 3' ou 5') a ligação da IRP leva a efeitos contrários na síntese das proteínas reguladas pelo ferro. A ligação de IRPs a IREs 3' estabiliza o mRNA resultando em aumento da síntese protéica, enquanto a ligação a IREs 5' impede a tradução do mRNA, resultando em diminuição da síntese protéica. As proteínas cujas mRNAs são regulados pela interação IRE/IRP incluem receptor de transferrina, ferritina, uma isoforma de DMT-1, ferroportina e a delta aminolevulínico sintetase 2 (ALAS-2). DcytB também é regulada pelos níveis de ferro intracelulares, contudo, não contém um IRE não podendo, desta forma, ser diretamente regulada pela atividade de IRP (FRAZER & ANDERSON, 2005; NEMETH & GANZ, 2006; GROTTTO, 2010).

A homeostase sistêmica é mantida pela comunicação entre as células que utilizam o ferro, sendo principalmente os precursores eritróides; os hepatócitos e macrófagos, responsáveis pelo seu armazenamento; e, os enterócitos duodenais que promovem sua absorção da dieta (FALZACAPPA & MUCKENTHALER, 2005). Esta comunicação é feita por um hormônio peptídico antimicrobiano pertencente à família das defensinas denominado hepcidina (KRAUSE *et al.*, 2000; PARK *et al.*, 2001).

Na regulação do metabolismo do ferro a hepcidina apresenta como células alvo os enterócitos, macrófagos e hepatócitos. A hepcidina limita o efluxo do ferro por se ligar à proteína exportadora do ferro, ferroportina, induzindo sua internalização e degradação. A expressão hepática deste hormônio é regulada conforme a disponibilidade de ferro nas reservas corporais, a necessidade para a eritropoese, bem como em consequência de hipóxia e em resposta a condições infecciosas ou inflamatórias. A produção de hepcidina é diminuída em resposta a estímulos que sabidamente aumentam a liberação do ferro celular (deficiência do ferro, eritropoese aumentada) e torna-se aumentada em condições nas quais a liberação do ferro é inibida (sobrecarga de ferro, inflamação) (PIGEON *et al.*, 2001; NICOLAS *et al.*, 2002; NEMETH *et al.*, 2004; FALZACAPPA & MUCKENTHALER, 2005; ANDERSON *et al.*, 2009). Desta forma, a hepcidina regula negativamente a captação de ferro pela transferrina, a principal proteína transportadora deste elemento (NAIRZ & WEISS, 2006; ZHANG & ENNS, 2009). Sendo a transferrina a maior fonte de ferro para a síntese de hemoglobina realizada pelos precursores eritróides, o aumento da hepcidina limita a eritropoese e é o fator de maior contribuição para a ADC (ZHANG & ENNS, 2009). Os mecanismos moleculares responsáveis pela estimulação da produção de hepcidina ainda não foram completamente elucidados, mas já é conhecido que a proteína HFE, hemojuvelina (HJV) e TfR2 agem como reguladores da expressão hepática do hormônio de acordo com os níveis de ferro circulantes (NAIRZ & WEISS, 2006; GROTTTO, 2010). Havendo aumento dos níveis de ferro estas estimulam a síntese de hepcidina pelo fígado, que inibe a absorção de ferro intestinal e sua liberação dos macrófagos, restabelecendo o equilíbrio do ferro (GROTTTO, 2010).

A hemojuvelina age como um co-receptor das BMPs (proteínas morfogenéticas ósseas), citocinas reguladoras da proliferação, diferenciação, apoptose e migração

tecidual. O complexo HJV-BMP-receptor BMP, fosforila proteínas intracelulares denominadas Smad o que culmina com o aumento da expressão do gene da hepcidina (BABITT *et al.*, 2006; GROTTTO, 2010). O mecanismo de ativação da HFE e do TfR2 não está completamente esclarecido (GROTTTO, 2010).

## 1.2 Anemia ferropriva

A anemia por deficiência de ferro é o distúrbio nutricional mais comum no mundo. Dois bilhões de pessoas, o que corresponde a mais de 30% da população mundial, são anêmicas principalmente devido à deficiência do ferro (WHO, 2012). Esta anemia é a fase final de um processo que inicia pelo consumo das reservas de ferro e continua com a depleção do ferro dos demais compartimentos nos quais ele está contido, comprometendo a eritropoese normal (ZAGO *et al.*, 2005).

As causas da deficiência de ferro são:

- 1) Aumento da demanda de ferro: período de crescimento rápido (crianças até dois anos e adolescentes), na gravidez e na amamentação.
- 2) Redução da ingestão: dietas carentes qualitativa ou quantitativamente (comuns em sociedades de baixa renda, vegetarianos estritos ou por dieta de emagrecimento mal orientada).
- 3) Redução da absorção, por acloridria, gastrectomia parcial ou total, síndrome do espru (reação alérgica a proteínas do trigo, que afeta a porção proximal do intestino delgado, onde o ferro é absorvido).
- 4) Perda crônica de sangue, por hemorragias crônicas do aparelho digestivo, verminoses (ancilostomíase e outras parasitoses), perdas menstruais excessivas e gravidezes múltiplas (LORENZI, 2003; COOK, 2005).

O diagnóstico laboratorial é baseado no hemograma, no estudo minucioso da série vermelha ao microscópio e em exames que avaliam a concentração de ferro no organismo (OLIVEIRA & NETO, 2004). A determinação da hemoglobina tem sido o método mais largamente usado para triagem da deficiência do ferro, mas quando é empregada isoladamente, apresenta sérias limitações para a identificação desta condição, devido a sua baixa especificidade e sensibilidade. A baixa sensibilidade ocorre porque um indivíduo com reservas normais de ferro deve perder uma grande

quantidade do elemento antes que a hemoglobina diminua abaixo das várias definições laboratoriais de anemia, refletindo o atraso da diminuição dos níveis de hemoglobina em relação à redução dos estoques de ferro. A baixa especificidade da hemoglobina para a identificação da deficiência do ferro é devido aos numerosos casos de outras anemias vistas concomitantemente na clínica. Em virtude destes muitos distúrbios que mimetizam a deficiência do ferro, medidas laboratoriais adicionais à dosagem de hemoglobina são necessárias para a correta identificação desta anemia (COOK, 2005; GROTTTO, 2010).

Na anemia ferropriva, a taxa de hemoglobina e o hematócrito estão diminuídos. O volume corpuscular médio (VCM) e a hemoglobina corpuscular média (HCM) são inferiores ao limite mínimo de referência e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) pode estar também reduzida nos casos mais graves. O volume do glóbulo vermelho é mais heterogêneo, então, o índice de anisocitose eritrocitária (RDW) apresenta valor superior ao normal (11,6 a 14,8%). A contagem de reticulócitos é normal ou baixa, aumentando rapidamente após o início da terapêutica. A dosagem de ferro sérico é baixa, a transferrina saturada de ferro é baixa, a capacidade total de ligação do ferro (CTLF) é alta e a ferritina é baixa (JAMES & LAING, 1994; UMBREIT, 2005; KILLIP *et al.*, 2007; LIU & KAFFES, 2012).

Apesar de muito empregada, a dosagem de ferro sérico apresenta alguns inconvenientes, pois a sua concentração exibe variações diurnas, sendo geralmente maior pela manhã que à tarde, e podendo transitoriamente chegar a valores de referência depois de refeições ou suplementos férricos orais. A flutuação circadiana é devida, em grande parte, à variação na liberação do ferro do SRE para o plasma (WORWOOD, 1997; COOK *et al.*, 2003; LABBÉ & DEWANJI, 2004; PASRICHA *et al.*, 2010). Adicionalmente, mudanças no suprimento ou na demanda de ferro devido à infecção, inflamação ou injúria tecidual causam variações rápidas em seu valor sérico (WORWOOD, 1997). A dosagem do ferro encontra-se baixa na presença de doenças inflamatórias sendo, assim, desaconselhada para diagnosticar a anemia ferropriva. Neste caso, marcadores tais como proteína C reativa, podem auxiliar na identificação de um processo inflamatório concomitante (PASRICHA *et al.*, 2010). Além disso, as concentrações de ferro sérico exibem variação de acordo com a metodologia usada

para a sua dosagem e também com a presença de hemólise (COOK *et al.*, 2003). Desta forma, a determinação do ferro sérico isoladamente é de valor limitado, devendo ser analisado em combinação com os outros parâmetros como a saturação da transferrina e ferritina sérica (GROTTO, 2010).

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

A ferritina, uma proteína de armazenamento do ferro, é uma medida universalmente disponível e bem padronizada que oferece importantes vantagens sobre o exame da medula óssea para a detecção da deficiência do ferro (HARRISON & AROSIO, 1996; COOK, 2005). A dosagem de ferritina sérica é atualmente o teste laboratorial aceito para diagnosticar a deficiência do ferro, e pacientes com uma concentração de ferritina sérica inferior a 25 ng/mL têm grande possibilidade de apresentarem deficiência de ferro (MAST *et al.*, 1998; KILLIP *et al.*, 2007). A ferritina sérica indica o nível da reserva de ferro do organismo (NOBILI *et al.*, 2001). Uma característica valiosa desta medida é que a sua concentração é diretamente proporcional às reservas de ferro do corpo em indivíduos saudáveis; 1µg/L de ferritina sérica corresponde a 120 µg de ferro/kg de peso corpóreo (FINCH *et al.*, 1986). Porém, sendo a ferritina uma proteína de fase aguda, uma limitação bem conhecida é a elevação de seus valores independentemente do nível de ferro corporal em pacientes com inflamação aguda ou crônica, malignidade, doenças hepatocelulares, alcoolismo, hipertireoidismo, uso de contraceptivos orais ou doença hepática (BRUGNARA, 2003; COOK, 2005; ZIMMERMANN, 2008). Assim, na presença de uma doença crônica, por exemplo, nenhum teste laboratorial do *status* do ferro por si só provê um diagnóstico exato da deficiência do ferro e um exame da medula óssea seria o mais indicado para estabelecer um diagnóstico definitivo (TELLINGEN *et al.*, 2001). A avaliação da concentração de ferro medular é o padrão-ouro no diagnóstico da deficiência do ferro e sua ausência considerada o marcador definitivo desta condição (PUNNONEN *et al.*, 1997; HIGGINS & ROCKEY, 2003; ZIMMERMANN, 2008). É feita usualmente por

métodos citoquímicos, e detecta a verdadeira deficiência do elemento distinguindo-a de outras doenças crônicas nas quais há um impedimento na liberação do ferro das células reticuloendoteliais (WORWOOD, 1997). Contudo esta técnica é invasiva, desconfortável, cara e demanda tempo e profissional especializado para coleta da amostra (TELLINGEN *et al.*, 2001; ZIMMERMANN, 2008).

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

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

A dosagem laboratorial de ZPP é realizada usando-se um hematofluorômetro e possui como vantagens a necessidade de pequeno volume de sangue, simplicidade da técnica, rapidez e reprodutibilidade. Contudo, para o laboratório clínico, os níveis de ZPP fornecem menos informação sobre a reserva de ferro de pacientes anêmicos que a dosagem de ferritina sérica (WORWOOD, 1997; METZGEROTH *et al.*, 2005; GROTTTO, 2010).

A desvantagem da ZPP para o diagnóstico da deficiência do ferro reside no fato de que esta se encontra aumentada não apenas na deficiência do ferro, mas também

em outras doenças que resultam em eritropoese insuficiente, tais como intoxicação pelo chumbo, anemia hemolítica e ADC (HASTKA *et al.*, 1993; HARTHOORN-LASTHUIZEN *et al.*, 1998).

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

Ainda para avaliar a deficiência do ferro, a medida do receptor sérico de transferrina (sTfR) pode ser utilizada (BRUGNARA, 2003). O receptor de transferrina (TfR) é uma proteína transmembrana que possui duas cadeias polipeptídicas idênticas com 95 kDa cada uma, ligadas por duas pontes dissulfeto. Este sistema interage com uma proteína denominada transferrina, responsável pelo transporte plasmático do ferro e que leva, a partir dessa interação, ferro às células. O complexo TfR-transferrina-ferro é internalizado via uma vesícula endocítica e, no compartimento intracelular, o ferro se dissocia do complexo TfR-transferrina. O ferro permanece no citosol, enquanto o complexo TfR-apotransferrina é reciclado de volta à superfície celular. Virtualmente todas as células, exceto células vermelhas maduras, têm TfR na sua superfície, mas os maiores números estão no eritron, placenta e fígado. Em um adulto normal, em torno de 80% de TfR estão nos precursores eritróides da medula óssea (COOK *et al.*, 1993; BEGUIN, 2003).

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

WORWOOD, 2002). Se a produção de células vermelhas está diminuída, como por exemplo, na ADC, anemia aplástica e na doença renal de estágio terminal, os valores de sTfR permanecem inalterados (SKIKNE *et al.*, 1990; FERGUSON *et al.*, 1992) diferentemente dos valores de ferritina (AHLUWALIA, 1998).

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

A determinação dos níveis de sTfR pode ser realizada por testes imunoenzimáticos (ELISA) e por nefelometria sendo que os valores de referência variam de acordo com o método utilizado, não havendo até o momento uma padronização dos mesmos (WORWOOD, 2002; GROTTTO, 2010).

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

Portanto, o *status* do ferro pode ser completamente avaliado usando a ferritina sérica como uma medida da reserva de ferro (depleção do ferro estocado), sTfR como uma medida da deficiência de ferro tecidual funcional (eritropoese deficiente em ferro) e

a dosagem de hemoglobina como uma medida da deficiência do ferro avançada (anemia ferropriva) (SKIKNE *et al.*, 1990).

### 1.3 Talassemias

As talassemias são anomalias hereditárias autossômicas recessivas comuns nos países da região do Mediterrâneo ao sudeste da Ásia, causadas por mais de 200 diferentes mutações no gene da globina, levando a uma alteração numérica das cadeias de globina (WEATHERALL, 2000; JOSHI *et al.*, 2004). Tais distúrbios genéticos são caracterizados pela diminuição parcial ou ausência total da produção de cadeias globínicas, sendo que os tipos de talassemia mais comumente encontrados e que apresentam relevância clínica são as formas  $\alpha$  e  $\beta$ . O desequilíbrio entre as cadeias alfa e beta resulta nas consequências clínicas da talassemia (HILLIARD & BERKOW, 1996; SARNAIK, 2005). O defeito nos genes (dois genes localizados no cromossomo 16) ligados à produção de cadeias  $\alpha$ -globínicas resulta na  $\alpha$ -talassemia e o defeito no gene para cadeia  $\beta$  (gene localizado no cromossoma 11), nas  $\beta$ -talassemias (OLIVEIRA & NETO, 2004).

A anormalidade bioquímica primária nas talassemias consiste no defeito quantitativo na síntese da HbA ( $\alpha_2\beta_2$ ), resultando em uma deficiência na hemoglobinação dos eritrócitos, uma anemia do tipo microcítica e hipocrômica, e o acúmulo de uma ou mais cadeias polipeptídicas da hemoglobina. O excesso das cadeias normais forma agregados instáveis que precipitam e oxidam a membrana dos precursores eritróides e hemácias circulantes, levando à sua uma destruição prematura (HILLIARD & BERKOW, 1996; HANDIN *et al.*, 2003; ZAGO *et al.*, 2005).

### **1.3.1 $\alpha$ -Talassemia**

A  $\alpha$ -talassemia resulta da deficiência de um, dois, três ou quatro genes para síntese de cadeia  $\alpha$ . Nesta, ocorre uma síntese não balanceada de cadeias globínicas devido à deficiência da cadeia  $\alpha$  e as anormalidades hematológicas da doença refletem a extensão deste desequilíbrio (CHEN *et al.*, 2000; LAFFERTY *et al.*, 2007).

A deficiência de quatro genes ( $--/--$ ) é caracterizada pela ausência da produção de cadeias  $\alpha$  e conseqüente excesso de cadeias  $\beta$  e  $\gamma$  que formam tetrâmeros instáveis  $\beta_4$  (HbH) e  $\gamma_4$  (Hb Bart's). Hb Bart's e HbH possuem grande afinidade pelo oxigênio e não o fornecem às células em tensões fisiológicas levando a uma grave hipóxia (SINGER, 2009). Tal situação é incompatível com a vida e resulta no quadro de hidropsia com morte fetal no terceiro trimestre de gravidez ou logo após o nascimento. A Hb Portland, mais efetiva na oxigenação tecidual, permite ao feto sobreviver até o terceiro trimestre (SINGER, 2009).

A deficiência de três genes (Doença da Hemoglobina H,  $\alpha/--$  ou  $-\alpha/--$ ;  $-/\alpha-$  ou  $- -/\alpha$ ), cursa com anemia intensa e pode requerer transfusões periódicas. A deleção de dois genes ( $\alpha/\alpha-$  ou  $-\alpha/-\alpha$ ;  $-/\alpha\alpha$  ou  $\alpha\alpha/--$ ) da cadeia  $\alpha$  globínica produz microcitose e hipocromia leves, com uma concentração de hemoglobina normal ou discretamente diminuída. A deficiência de um gene ( $\alpha/\alpha\alpha$  ou  $-\alpha/\alpha\alpha$ ,  $\alpha\alpha/-\alpha$  ou  $\alpha\alpha/\alpha-$ ) é hematológica e clinicamente assintomática (forma silenciosa) (HILLIARD & BERKOW, 1996; CLARKE & HIGGINS, 2000; JOSHI *et al.*, 2004; SARNAIK, 2005; MARENCO-ROWE, 2007; LEUNG *et al.*, 2008). Contudo, mesmo dentro de um determinado genótipo, ocorre uma variação do grau de anemia, um fenômeno ainda não bem compreendido (SINGER, 2009).

A eletroforese de hemoglobina é amplamente utilizada para a classificação das talassemias (PAN *et al.*, 2005). No caso da  $\alpha$ -talassemia, tal exame mostra diminuição variável das hemoglobinas normais (A, A<sub>2</sub> e F), de acordo com o comprometimento da capacidade de síntese de cadeia  $\alpha$ . Uma banda de migração rápida, correspondente ao tetrâmero de cadeias  $\beta$  (HbH), é visível nos casos mais graves. Na deficiência de quatro genes (Hidropsia fetal) é mantida a síntese de hemoglobina embrionária (Portland) e

aparece uma banda de migração rápida correspondente às cadeias  $\gamma$  (Hb Bart's). A hemoglobina Bart's (tetrâmeros  $\gamma_4$ ) é encontrada nas primeiras semanas de vida enquanto a hemoglobina H (tetrâmeros  $\beta_4$ ) pode ser observada em pacientes adultos (SARNAIK, 2005).

Outro método diagnóstico para as  $\alpha$ -talassemias é a pesquisa de HbH. A HbH é uma hemoglobina instável que se precipita nos eritrócitos podendo ser visualizada após coloração vital como pequenos pontos azulados dispostos homoganeamente. Contudo, esta técnica apresenta uma baixa sensibilidade para o traço  $\alpha$ -talassêmico devendo ser utilizada apenas como um teste confirmatório, e não como um método de rastreamento da  $\alpha$ -talassemia (HARTWELL *et al.*, 2005). O número de hemácias com inclusões de HbH é influenciado pelo genótipo da  $\alpha$ -talassemia, sendo mais elevado em síndromes com um maior excesso de cadeias  $\beta$  (SKOGERBOE *et al.*, 1992). A observação de corpos de inclusão de HbH requer prática do analista e tempo disponível, além do fato de que formas diferentes da  $\alpha$ -talassemia podem mostrar padrões de precipitação também diferentes: as hemácias com corpos de inclusão aparecem ocasionalmente (uma a duas hemácias em aproximadamente 10 campos no aumento de 1000X) em carreadores de genótipo  $-\alpha/\alpha$  e em carreadores de mutações não deletionais. Já em pacientes com doença de HbH, podem ser visualizados numerosos eritrócitos com precipitados de HbH (NAOUM, 1997; HARTEVELD & HIGGS, 2010). Assim, a ausência desses corpos não exclui a  $\alpha$ -talassemia uma vez que mesmo em indivíduos com deleção de dois genes  $\alpha$ , apenas uma ou duas inclusões podem ser observadas após uma rigorosa busca (TRENT, 2006).

Em função da impossibilidade de detecção através de qualquer teste bioquímico convencional dos carreadores de  $\alpha$ -talassemia que possuem um ou dois genes inativos (SIVERA *et al.*, 1997), tais formas da doença em adultos podem ser sugeridas pela presença de uma leve microcitose e hipocromia e níveis normais de HbA<sub>2</sub> e HbF, associados à ausência de deficiência do ferro. Entretanto, o diagnóstico preciso requer a demonstração de mutações nos genes  $\alpha$ -globínicos detectáveis por métodos de biologia molecular; ou, ainda, por meio de estudos da síntese de cadeias globínicas mostrando uma diminuição na razão entre cadeias  $\alpha$  e cadeias  $\beta$  (HILLIARD &

BERKOW, 1996; ELDIBANY *et al.*, 1999). Este último método apresenta grande acurácia, mas é bastante oneroso dificultando sua aplicação na rotina laboratorial (ELDIBANY *et al.*, 1999). Atualmente, vários testes diagnósticos confiáveis e rápidos, utilizando reação em cadeia da polimerase (PCR), têm sido desenvolvidos para a detecção das mutações mais comuns delecionais e não delecionais.

O diagnóstico genético da  $\alpha$ -talassemia é importante não apenas para elucidar a patologia molecular da doença, mas também para a detecção do heterozigoto e realização do diagnóstico pré-natal em famílias que possuem risco de gerar indivíduos com doença de HbH e síndrome da hidropsia fetal (WAYE & CHUI, 2001; SHAJI *et al.*, 2003; LAFFERTY *et al.*, 2007). Quando ambos os pais são carreadores de duas deleções do gene  $\alpha$  em *cis* ( $--/\alpha\alpha$ ), há 25% de probabilidade do feto ser portador de quatro deleções e quadro clínico de hidropsia fetal ( $--/--$ ) (TANG *et al.*, 2001; LEUNG *et al.*, 2008).

A incidência relativamente alta do genótipo  $-\alpha^{3.7}$  nas populações mundiais e sua elevada frequência no Oriente Médio, África, Índia e outros países constitui um real problema para casais de risco, principalmente quando a frequência das outras mutações causadoras de  $\alpha$ -talassemia-1 (remoção parcial ou completa de ambos os genes  $\alpha$  não ocorrendo síntese de cadeias  $\alpha$  no cromossomo no qual a mutação está presente) são também significativas (BAYSAL & HUISMAN, 1994). Além disso, embora a anemia nos carreadores de  $\alpha$ -talassemia esteja ausente ou seja discreta, é importante diagnosticá-los a fim de evitar análises laboratoriais repetidas e desnecessárias que são, muitas vezes, onerosas (SIVERA *et al.*, 1997; LAFFERTY *et al.*, 2007).

### **1.3.2 $\beta$ -Talassemia**

As  $\beta$ -talassemias se referem a um grupo de distúrbios genéticos da hemoglobina em que há uma síntese reduzida ( $\beta^+$ -talassemia) ou até ausência ( $\beta^0$ -talassemia) na produção de cadeias  $\beta$ . O grau de redução da produção de cadeias  $\beta$  é determinado pelo tipo de mutação no gene  $\beta$ -globínico do cromossomo 11 (WEATHERALL, 1998; WEATHERALL, 2000; HANDIN *et al.*, 2003; GALANELLO & ORIGA, 2010). Essa

redução ( $\beta^+$ -talassemia) ou ausência ( $\beta^0$ -talassemia) de cadeias  $\beta$  resulta em excesso relativo de cadeias  $\alpha$  livres que se acumulam dentro das células eritróides. As cadeias  $\alpha$  livres não são capazes de formar tetrâmeros viáveis e precipitam-se formando corpos de inclusão nos precursores eritróides. Quando esta precipitação ocorre na medula óssea observam-se fenômenos como peroxidação dos lipídeos da membrana eritrocitária e geração de radicais livres, espécies ativadas do oxigênio. Além disso, o excesso de cadeias  $\alpha$  acumuladas e seus produtos de degradação interagem com a membrana, causando anormalidades na espectrina e banda 4.1. Desta forma, os eritrócitos de pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia exibem uma deformabilidade celular marcadamente reduzida com aumento da rigidez e diminuição da estabilidade mecânica da membrana. Ainda em nível de células eritroblásticas, a precipitação de globinas  $\alpha$  causa o bloqueio da síntese de DNA com consequente interrupção da síntese de globinas. O somatório dos mecanismos citados incluindo precipitação de globina  $\alpha$ , rigidez celular e lesão do DNA, provoca a eritropoese ineficaz responsável pela anemia e aumento da absorção do ferro observada nesta doença. Os eritrócitos com corpos de inclusão compostos por globinas  $\alpha$ , ao atingirem o sangue periférico, são sequestrados nos sinusóides esplênicos durante a circulação em virtude de sua rigidez associada às lesões da membrana. O resultado dessa atuação fisiopatológica é uma anemia hemolítica de graus variáveis com aumento da concentração de bilirrubina indireta e esplenomegalia. Como em qualquer anemia verdadeira ocorre o estímulo para a produção de eritropoetina (EPO) com consequente expansão ineficaz da medula óssea causando deformidades ósseas típicas da talassemia (NAOUM, 1997; WEATHERALL, 1998; WEATHERALL, 2000; HANDIN *et al.*, 2003; SARNAIK, 2005; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005; GALANELLO & ORIGA, 2010; HIGGS *et al.*, 2012). As  $\beta$ -talassemias incluem três grandes categorias clínicas: a  $\beta$ -talassemia maior (completa ausência da produção de cadeias beta e herança de dois alelos mutados no gene  $\beta$ ), associada a manifestações clínicas graves e quase sempre potencialmente fatal; a  $\beta$ -talassemia menor (diminuição da produção de cadeias beta e herança de um alelo mutado no gene  $\beta$ ) com manifestações clínicas leves ou mínimas; e formas intermediárias entre a maior e a menor, a  $\beta$ -talassemia intermediária, com

comprometimento parcial da expressão dos genes e anemia menos grave que não requer transfusões periódicas (HIGGS, 2004; URBINATI *et al.*, 2006; GALANELLO & ORIGA, 2010). Na  $\beta$ -talassemia menor e nas formas intermediárias leves, há uma anemia discreta e persistente, que piora em situações de sobrecarga do organismo, como na gravidez, ocorrência de doenças crônicas, verminoses, etc. De modo geral, não há necessidade de transfusão de sangue (NAOUM, 1997; WEATHERALL, 2000).

Em casos raros de  $\beta$ -talassemia associada a outras características, o defeito molecular não se encontra no *cluster* do gene  $\beta$ -globínico, mas, no gene que codifica o fator de transcrição TFIID ( $\beta$ -talassemia associada à tricotiodistrofia) ou no fator de transcrição GATA-1 ligado ao cromossomo X (trombocitopenia com talassemia ligadas ao cromossomo X) (VIPRAKASIT *et al.*, 2001; FRESON *et al.*, 2002).

Em relação à  $\beta$ -talassemia, a eletroforese de hemoglobina mostra ausência ou diminuição da HbA e aumento variável de HbA<sub>2</sub> e HbF, conforme a deficiência para a síntese de cadeias  $\beta$  (HILLIARD & BERKOW, 1996; NAOUM, 1997; LORENZI, 2003; GALANELLO & ORIGA, 2010). Na  $\beta$ -talassemia menor, um aumento de HbA<sub>2</sub> é o parâmetro indicador da presença de tal hemoglobinopatia, embora existam outras causas, contudo incomuns, como algumas hemoglobinas instáveis, hipertireoidismo e anemia megaloblástica, onde HbA<sub>2</sub> estaria aumentada (SARNAIK, 2005; TRENT, 2006).

A microscopia nas talassemias revela hemácias de formas e tamanhos muito variados (anisopoiquilocitose), presença de hemácias em alvo, de esquisócitos, ponteados basófilos e corpúsculos de Howell-Jolly, além de eritroblastos cuja quantidade está relacionada ao grau de anemia e não são usualmente encontrados no filme sanguíneo de pacientes com formas menores de talassemia. A contagem de reticulócitos é elevada e proporcional ao grau de hemólise (HILLIARD & BERKOW, 1996; LORENZI, 2003).

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

### **1.3.3 Epidemiologia das talassemias**

A talassemia é o distúrbio monogênico mais comum do mundo (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998). Carreadores de  $\beta$ -talassemia encontram-se em todo o mundo, com maior frequência entre descendentes de países do Mediterrâneo, Oriente Médio, Ásia Central, Índia, sul da China e em alguns países em desenvolvimento (NOBILI *et al.*, 2001; HIGGS *et al.*, 2012). Nas áreas onde a talassemia é prevalente, a frequência de carreadores de  $\alpha$ -talassemia varia de 1% (no sul da Espanha) a 90% (populações tribais da Índia). Similarmente, a frequência de carreadores da  $\beta$ -talassemia pode variar de 1% (norte da Itália) a 50-70% (em algumas regiões do sudeste da Ásia) (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998). Variações consideráveis ocorrem mesmo dentro de um único país.

Foi estimado que no mundo existem 270 milhões de carreadores de alelos mutantes da globina que podem potencialmente causar formas graves de talassemia e hemoglobinopatia (incluindo a anemia falciforme), e todo ano nascem em torno de 300 a 400 mil crianças gravemente afetadas (ANGASTINIOTIS & MODELL, 1998). Também tem sido observado nos últimos 50 anos, que com a melhoria da economia mundial e a diminuição global dos índices de mortalidade infantil, a talassemia está rapidamente emergindo como um grande problema de saúde e econômico em países em desenvolvimento, uma vez que as crianças com talassemia que de outra maneira teriam morrido de infecção e má nutrição, agora sobrevivem e requerem tratamento por toda a vida. Portanto, no mundo todo, a talassemia é um grave problema hematológico que se encontra em ascensão em países desenvolvidos e em desenvolvimento (WEATHERALL & CLEGG, 2001).

Além disso, os avanços no diagnóstico das talassemias, particularmente a introdução de métodos moleculares no caso da  $\alpha$ -talassemia na sua forma menor; e, o maior acesso da população em geral a serviços de saúde, possibilitou a realização do diagnóstico de talassemia em indivíduos que anteriormente não tinham esclarecida a causa da anemia, elevando, conseqüentemente, a frequência deste distúrbio.

### **1.3.4 Aspectos moleculares das talassemias**

#### **1.3.4.1 Alfa-talassemia**

O complexo do gene alfa globínico inclui um gene embrionário  $\zeta$ , um pseudogene  $\zeta$ , uma duplicação dos genes  $\alpha$  inativos (pseudogenes  $\psi_2$  e  $\psi_1$ ) e dois genes  $\alpha$  globínicos ativos ( $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ ) dispostos na ordem 5' -  $\zeta$  -  $\psi\zeta$  -  $\psi_2$  -  $\psi_1$  -  $\alpha_2$  -  $\alpha_1$  - 3' que ocupam aproximadamente 30 Kb do braço curto do cromossomo 16, na banda 16p13.3. Uma vez que todo indivíduo possui dois cromossomos 16, há um total de quatro genes  $\alpha$  globínicos funcionais ( $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ) (WAYE & CHUI, 2001; ZAGO *et al.*, 2005).

A sequência dos genes  $\alpha$  ao longo do cromossomo reflete sua ordem de ativação e expressão durante a ontogênese (BERNINI & HARTEVELD, 1998; BARBOUR *et al.*, 2000). Os genes globínicos  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  estão localizados próximos ao fim do braço curto do cromossomo 16, em uma região que consiste de três segmentos duplicados (X, Y, Z) separados por regiões não homólogas I, II e III. Os genes  $\alpha$  estão inseridos nas subregiões homólogas  $Z_2$  e  $Z_1$  e suas regiões codificantes são idênticas, levando à produção de cadeias globínicas iguais. As diferenças estruturais entre  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  se restringem apenas ao segundo intron, à região 3' não traduzida (3'-UTR) e ao sítio poli-A (FOGLIETTA *et al.*, 1996; TANG *et al.*, 2001). Em geral, os genes  $\alpha$  são compactos compreendendo 1 a 2 Kb, sendo divididos em três exons separados por dois introns (HIGGS *et al.*, 1989). As principais sequências reguladoras estão localizadas em um segmento de 24 Kb, das quais a principal se situa a -40Kb da região de capeamento do gene  $\zeta$  e é denominado HS-40 (HIGGS *et al.*, 1990; ZAGO *et al.*, 2005). Embora os genes  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  codifiquem cadeias globínicas idênticas, o gene  $\alpha_2$  é responsável pela produção do dobro das cadeias globínicas quando comparado ao gene  $\alpha_1$ . Portanto, mutações no gene  $\alpha_2$  são mais comuns e levam a fenótipos mais graves (CHUI, 2005).

A  $\alpha$ -talassemia é uma das hemoglobinopatias mais comuns no mundo (GARSHASBI *et al.*, 2003; HARTEVELD & HIGGS, 2010) e a deficiência da cadeia globínica  $\alpha$  resulta de inativação parcial ou completa dos genes  $\alpha$  globínicos duplicados. Geralmente, a inativação parcial é proveniente de mutações não

delecionais ou deleções curtas que envolvem um dos genes  $\alpha$ , sendo denominada  $\alpha$ -talassemia-2 ou  $\alpha^+$ -talassemia, enquanto a completa inativação ocorre devido às deleções de ambos os genes  $\alpha$ , originando a  $\alpha$ -talassemia-1 ou  $\alpha^0$ -talassemia. A interação de  $\alpha$ -talassemia-2 e  $\alpha$ -talassemia-1 produz a doença de HbH, a forma clínica mais grave da  $\alpha$ -talassemia compatível com a vida (SHALMON *et al.*, 1994; HARTEVELD & HIGGS, 2010). Estas alterações dos genes globínicos  $\alpha_2$  e/ou  $\alpha_1$  causam uma redução ou mesmo uma completa supressão da síntese de cadeias globínicas  $\alpha$  (FOGLIETTA *et al.*, 1996).

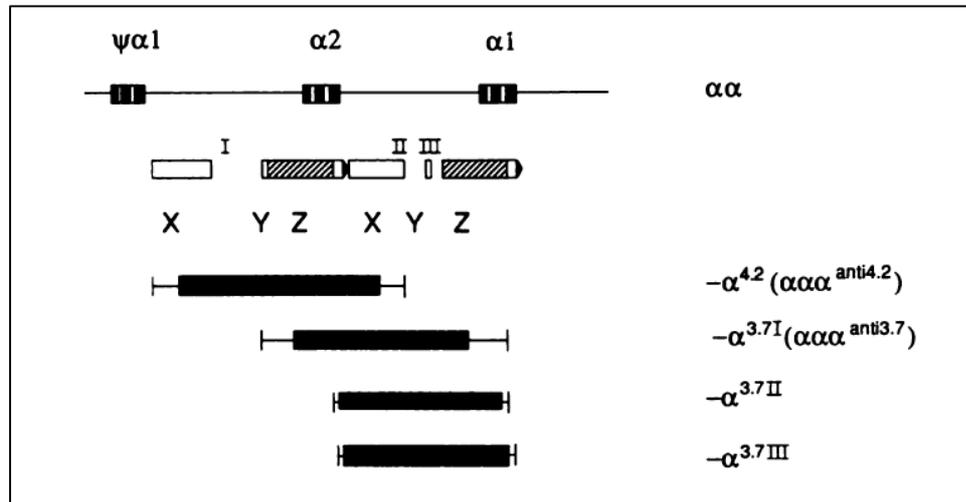
O número de genes globínicos  $\alpha$  não mutados está relacionado à ampla diversidade clínica observada nas  $\alpha$ -talassemias, que varia de um traço talassêmico silencioso à grave anemia. A  $\alpha$ -talassemia-2 heterozigota ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) apresenta uma leve deficiência de cadeias  $\alpha$  proveniente da presença de apenas três genes funcionais, enquanto a  $\alpha$ -talassemia-2 homozigota ( $-\alpha/-\alpha$ ) e a  $\alpha$ -talassemia-1 heterozigota ( $--/\alpha\alpha$ ) têm uma deficiência moderada de cadeias  $\alpha$  devido à presença de dois únicos genes funcionais. Clinicamente, embora a deleção de um ou dois genes  $\alpha$  resulte em microcitose e hipocromia, há pouca ou nenhuma anemia. Contudo, a doença de Hemoglobina H ( $--/-\alpha$ ), resultado de uma combinação de uma  $\alpha$ -talassemia-2 heterozigota e uma  $\alpha$ -talassemia-1 heterozigota, apresenta uma significativa deficiência de cadeias  $\alpha$  causada pela deleção de três genes. Os pacientes portadores de doença de Hemoglobina H apresentam índices eritrocitários bastante alterados e uma redução de 25% a 30% nos valores da hemoglobina e hematócrito (TANG *et al.*, 2001). Carreadores heterozigotos de deleções causadoras de  $\alpha$ -talassemia-1 possuem o potencial risco de gerarem filhos com doença de Hemoglobina H ou, ainda, com hidropsia fetal (CHUI, 2005).

#### 1.3.4.1.1 Deleções causadoras de $\alpha^+$ -talassemia ou $\alpha$ -talassemia-2

As  $\alpha$ -talassemias resultam de mais de 80 mutações nos genes  $\alpha$ -globínicos (WEATHERALL, 2001). Ao contrário da  $\beta$ -talassemia, cujas mutações causadoras são principalmente mutações pontuais, a maioria dos defeitos genéticos nas  $\alpha$ -talassemias

são deleções (GARSHASBI *et al.*, 2003). A heterozigose para a deleção de ambos os genes  $\alpha$  ligados ( $--/\alpha\alpha$ ), conhecida como  $\alpha^0$ -talassemia, causa anemia microcítica e hipocrômica discreta e assintomática. A maioria dos carreadores de uma única deleção ( $-\alpha/\alpha\alpha$ ) parece clinicamente e hematologicamente normal, embora se considerados como um grupo, tais indivíduos apresentem valores de VCM e HCM levemente reduzidos (VIPRAKASIT *et al.*, 2003).

Dentre as deleções únicas do gene globínico  $\alpha$ , a mais comum é a perda de um fragmento de 3.7 Kb ( $-\alpha^{3.7}$ ), que inclui a porção final 3' do gene  $\alpha_2$ , a região intergênica  $\alpha_2$ - $\alpha_1$  e a porção 5' inicial do gene  $\alpha_1$ , sendo produzida por um *crossing-over* desigual ocorrido entre as regiões homólogas  $Z_2$  e  $Z_1$  - *crossing-over* à direita (**Figura 2 e Figura 3**). Os dois produtos desta recombinação são um gene  $\alpha$  híbrido e um grupamento com o gene  $\alpha$  triplicado  $\alpha\alpha\alpha^{\text{anti } 3.7}$  (**Figura 3**). A deleção  $-\alpha^{3.7}$  pode ser subdividida em três tipos de acordo com o local do *crossing-over* dentro das regiões Z: Tipo I, caso o sítio de recombinação esteja à esquerda do sítio de restrição da enzima *ApaI*; Tipo II se o local do *crossing-over* estiver à direita do sítio de *ApaI*. Neste último caso, o gene  $\alpha$  híbrido perde o sítio de restrição para a enzima (FOGLIETTA *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2000; CHONG *et al.*, 2000; ZAGO *et al.*, 2005). O tipo I é um gene recombinado  $\alpha_1$  que possui as sequências 5' UTR pertencentes ao gene  $\alpha_2$ ; o tipo II consiste em um gene híbrido  $\alpha_2/\alpha_1$  e o tipo III consiste de um gene  $\alpha_2$  que retém suas sequências flanqueadoras originais 5' e 3' (BERNINI & HARTEVELD, 1998).

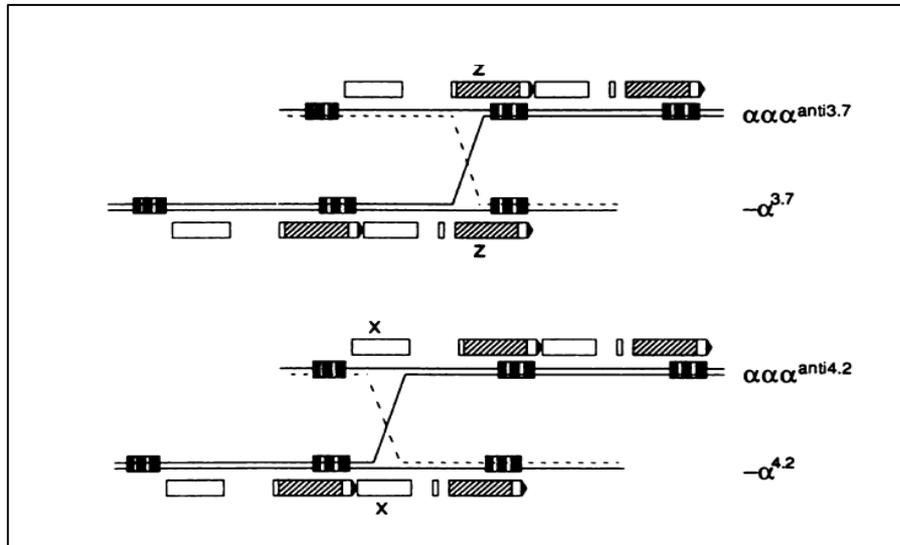


**Figura 2** - Deleções causadoras de  $\alpha^+$ -talassemia. As regiões duplicadas XYZ contendo os genes  $\alpha$  e as regiões não homólogas (I, II e III) estão indicadas. A extensão de cada deleção está representada por blocos sólidos (extraído e adaptado de HIGGS *et al.*, 1989)

Outra deleção de um gene  $\alpha$  comum é a deleção de 4.2 Kb ( $-\alpha^{4.2}$ ) (CHONG *et al.*, 2000; GARSHASBI *et al.*, 2003) que também apresenta uma triplicação  $\alpha\alpha\alpha^{4.2}$  correspondente à adição do segmento deletado. Esta deleção resulta de pareamento errôneo e recombinação entre sequências homólogas localizadas no segmento X ( $X_2$  e  $X_1$ ), afetando todo o gene  $\alpha_2$  (**Figuras 2 e 3**) (FOGLIETTA *et al.*, 1996; CHEN *et al.*, 2000; HANDIN *et al.*, 2003).

As deleções que causam  $\alpha^+$ -talassemia-2 ( $\alpha^+$ -talassemia),  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ , são as formas mais comuns encontradas no mundo inteiro (KATTAMIS *et al.*, 1996; URBINATI *et al.*, 2006). Há evidências de que a  $\alpha^+$ -talassemia heterozigota confere proteção contra a malária, o que pode ter contribuído para a elevada frequência de  $\alpha^+$ -talassemia na África (MOCKENHAUPT *et al.*, 2004).

Outros determinantes menos comuns de  $\alpha$ -talassemia-2 são as deleções  $-\alpha^{2.7}$  e  $-\alpha^{3.5}$  (BAYSAL & HUISMAN, 1994; HANDIN *et al.*, 2003).



**Figura 3** - Mecanismo de ocorrência das deleções  $-\alpha^{3.7}$  e  $-\alpha^{4.2}$ . *Crossing-over* entre regiões Z alinhadas erroneamente originam os cromossomos  $-\alpha^{3.7}$  e  $\alpha\alpha^{3.7}$ . De maneira semelhante, o *crossing-over* entre regiões X desalinhadas geram os cromossomos  $-\alpha^{4.2}$  e  $\alpha\alpha^{\text{anti}4.2}$  (extraído e adaptado de HIGGS, 1993).

Os indivíduos que possuem três genes  $\alpha$  funcionais apresentam índices hematológicos (VCM e HCM) normais ou apenas discretamente reduzidos. De forma contrária, indivíduos com apenas dois genes  $\alpha$  funcionais apresentam valores de VCM e HCM claramente reduzidos. Geneticamente, estes podem ser homocigotos para  $\alpha^+$ -talassemia ( $-\alpha/-\alpha$ ) ou portadores de  $\alpha^0$ -talassemia ( $-/-\alpha\alpha$ ), uma forma severa da doença na qual ambos os genes  $\alpha$  de um mesmo cromossomo são inativos (LIU *et al.*, 2000).

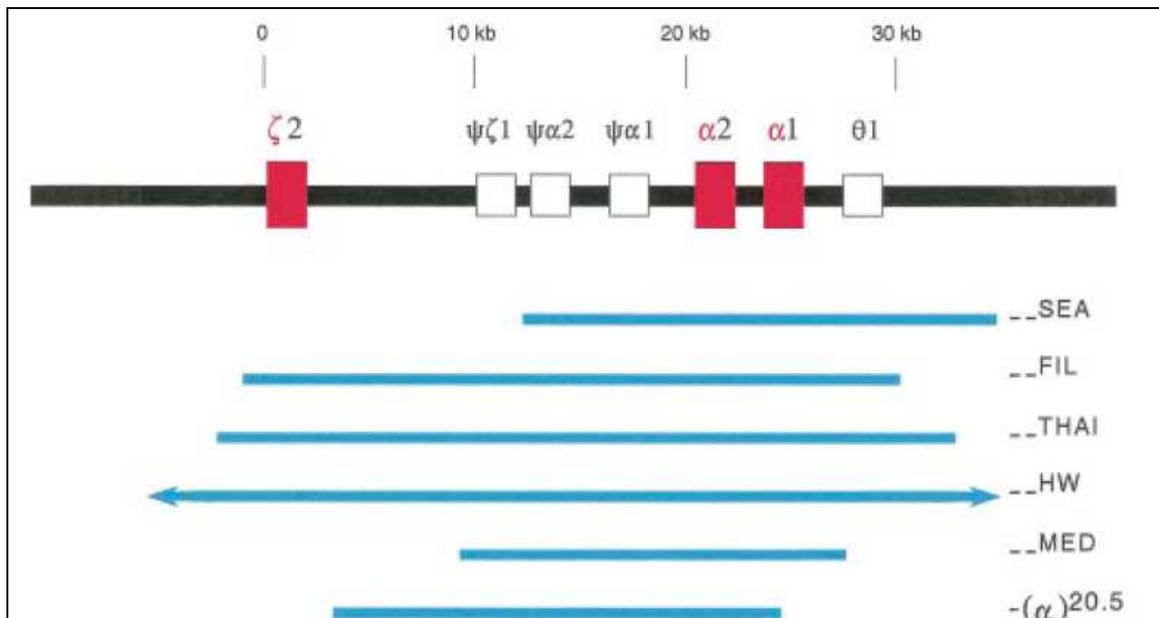
#### 1.3.4.1.2 Deleções causadoras de $\alpha^0$ -talassemia ou $\alpha$ -talassemia-1

Todas as deleções causadoras de  $\alpha^0$ -talassemias removem parcialmente ou completamente ambos os genes  $\alpha$  e, portanto, não há síntese de cadeias  $\alpha$  no cromossomo onde a deleção estiver presente. Tais deleções são caracterizadas pelo seu comprimento e local de descoberta (HIGGS *et al.*, 1989; HIGGS, 1993; WEATHERALL, 2001).

As  $\alpha^0$ -talassemias alcançam a maior frequência no sudeste da Ásia, onde em algumas regiões mais de 10% da população é carreadora desta alteração. No leste do Mediterrâneo, as  $\alpha^0$ -talassemias também são bastante comuns (HIGGS & WEATHERALL, 2009). A deleção --<sup>SEA</sup> é mais comumente encontrada no Sudeste da Ásia causando  $\alpha^0$ -talassemia. Esta deleção envolve uma região de aproximadamente 20 Kb e remove os genes  $\psi\alpha_2$ ,  $\psi\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$  e  $\theta_1$  (**Figura 4**). Outras deleções encontradas em populações asiáticas são --<sup>THAI</sup> e --<sup>FIL</sup>, sendo tais deleções particularmente longas. A prevalência da  $\alpha$ -talassemia-1, principalmente devido ao genótipo --<sup>SEA</sup>, é alta na Ásia, o que faz com que a doença de HbH e a hidropsia fetal causem um significativo problema de saúde pública no sudeste asiático. A deleção HW compreende uma extensão de mais de 300 Kb removendo todo o cluster  $\zeta$ - $\alpha$ -globínico e foi encontrada, inicialmente, em uma família chinesa (**Figura 4**) (FISCHEL-GHODSIAN *et al.*, 1988; WAYE & CHUI, 1992; TANG *et al.*, 1993; KATTAMIS *et al.*, 1996; PORNPRASERT *et al.*, 2008; SINGER, 2009).

Nos países do Mediterrâneo, a migração populacional é um fenômeno sociológico comum que tem levado a uma dispersão das variantes da  $\alpha$ -talassemia observadas em seus países. Os tipos deletoriais mais comuns nesta região são  $-(\alpha)^{20.5}$  e --<sup>MED</sup>. A deleção  $-(\alpha)^{20.5}$  remove uma região de 20.5 kb, enquanto --<sup>MED</sup> apresenta um ponto de quebra 5' na região 5' de  $\psi\zeta_1$  e o outro 3' na região 5' de  $\theta_1$  (**Figura 4**) (ORKIN & MICHELSON, 1980; NICHOLLS *et al.*, 1985; KATTAMIS *et al.*, 1996; CLARK & THEIN, 2004). Outras deleções observadas no Mediterrâneo são  $-(\alpha)^{5.2}$  e --<sup>SPAN</sup> (PRESSLEY *et al.*, 1980; VILLEGAS *et al.*, 1990).

Embora deleções de um gene  $\alpha$  sejam comuns entre africanos,  $\alpha$ -talassemia-1 é muito rara tornando difícil o encontro do fenótipo de hidropsia fetal nesta população. Entre as deleções causadoras de  $\alpha$ -talassemia-1 nesta região pode ser citada a --<sup>GEO</sup> que remove aproximadamente 8.5 Kb e inclui ambos os genes  $\alpha$  e o gene  $\theta_1$  (FEI *et al.*, 1992; KATTAMIS *et al.*, 1996).



**Figura 4** - Deleções no grupamento  $\alpha$ -globínico causadoras de  $\alpha^0$ -talassemia. Este grupamento está localizado no braço curto do cromossomo 16 próximo ao telômero. Os três genes globínicos ativos  $\zeta_2$ ,  $\alpha_2$  e  $\alpha_1$  estão representados por caixas vermelhas e os quatro pseudogenes por caixas abertas. A extensão das deleções está representada por linhas azuis (extraído de CHUI & WAYE, 1998).

Raras deleções causadoras de  $\alpha$ -talassemia-1 removem a região regulatória que se localiza a 40-50 Kb do *cluster*  $\alpha$  deixando intactos os genes  $\alpha$  globínicos. Esta região é composta de quatro sequências consenso mínimas altamente conservadas evolutivamente e correspondem a sítios hipersensíveis a DNase eritróide específica e denominados HS-48, HS-40, HS-33 e HS-10. Destes elementos apenas HS-40 é essencial para a expressão dos genes  $\alpha$  (HARTEVELD & HIGGS, 2010).

#### 1.3.4.1.3 Formas não delecionais

As formas não delecionais de  $\alpha$ -talassemia envolvem mutações pontuais, deleções ou inserções de poucos nucleotídeos resultando em expressão diminuída dos genes  $\alpha$ . Tais mutações atingem diferentes níveis da expressão e regulação gênica incluindo *splicing* do RNA, adição da cauda poli-A, tradução defectiva causada por

*frameshifts* e mutações sem sentido e produção de variantes da cadeia  $\alpha$  globínica altamente instáveis devido a mutações no códon de terminação (HIGGS & WEATHERALL, 2009).

Ao contrário da  $\beta$ -talassemia, este tipo de mutação constitui a minoria das alterações moleculares gerando  $\alpha$ -talassemia. Quase todos os defeitos afetam a expressão do gene  $\alpha_2$ , em concordância com a expressão dominante deste gene e podem levar aos fenótipos de  $\alpha^+$ -talassemia ou  $\alpha^0$ -talassemia (BERNINI & HARTEVELD, 1998). Contudo, ao contrário da deleção  $-\alpha^{4.2}$  do gene  $\alpha_2$ , nenhum aumento compensatório da expressão do gene  $\alpha_1$  ocorre nas mutações não deletionais e, portanto, o fenótipo destas é mais grave que nas formas deletionais comuns, assemelhando-se mais à  $\alpha^0$ -talassemia que  $\alpha^+$ -talassemia (HANDIN *et al.*, 2003; VICHINSKY, 2009; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

$\alpha^{\text{TSaudi}}\alpha$  e  $\alpha^{\text{T}}\alpha$  são duas formas não deletionais de  $\alpha$ -talassemia causadas por substituições de bases na sequência altamente conservada de poliadenilação AATAAA. Tais mutações impossibilitam a síntese de mRNA normal de  $\alpha_2$  e, possivelmente, também diminuem a expressão do gene  $\alpha_1$  adjacente.  $\alpha^{\text{TSaudi}}\alpha$  consiste na alteração de AATAAA  $\rightarrow$  AATAAG nesta região do gene  $\alpha_2$  e a  $\alpha^{\text{T}}\alpha$  consiste na substituição AATAAA  $\rightarrow$  AATGAA, também no gene  $\alpha_2$  (THEIN *et al.*, 1988; YUREGIR *et al.*, 1992; KATTAMIS *et al.*, 1996).

A hemoglobina Constant Spring (HbCS) é a forma mais prevalente de  $\alpha$ -talassemia não deletional sendo originada de uma mutação TAA  $\rightarrow$  CAA no códon terminal do gene  $\alpha_2$ , resultando na produção de cadeias  $\alpha$ -globínicas anormalmente alongadas. A síntese desta cadeia alongada se encontra reduzida, pois o mRNA transcrito é instável, fazendo com que HbCS apresente um efeito semelhante à  $\alpha$ -talassemia (TANGVARASITTICHAJ *et al.*, 2005; SINGSANAN *et al.*, 2007; SINGER, 2009).

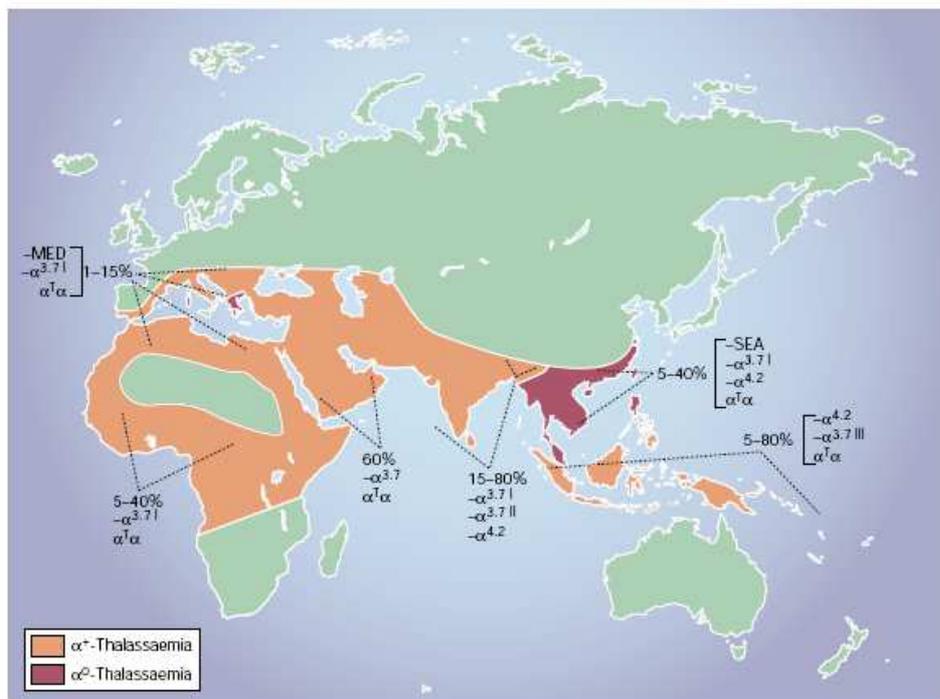
Já na hemoglobina Quong Sze, primeiramente descrita na China, ocorre uma mutação no códon 125 CTG (leucina) para CCG (prolina) do gene  $\alpha_2$ . Esta variante está associada a níveis e atividade normais de  $\alpha$ mRNA, porém as cadeias  $\alpha$  globínicas

produzidas são altamente instáveis sendo rapidamente destruídas por proteólise (HIGGS *et al.*, 1989; WAYE & CHUI, 2001; ZAGO *et al.*, 2005; SURA *et al.*, 2007).

Nas regiões do Mediterrâneo as mutações pontuais no gene  $\alpha$  mais comuns são  $\alpha^{\text{NcoI}}$  e  $\alpha^{\text{Hph}}$ . Os genótipos  $\alpha^{\text{NcoI}}\alpha$  e  $\alpha\alpha^{\text{NcoI}}$  são causados por substituições de bases no códon de iniciação da tradução ATG nos genes  $\alpha_2$  (ATG  $\rightarrow$  ACG) e  $\alpha_1$  (ATG  $\rightarrow$  GTG), respectivamente, impedindo a tradução. Esta alteração genética abole o sítio de restrição da enzima *NcoI* (FOGLIETTA *et al.*, 1996; ZAGO *et al.*, 2005).

Já a  $\alpha^{\text{Hph}}\alpha$  é uma deleção de cinco nucleotídeos (o pentanucleotídeo TGAGG) no sítio doador de *splicing* do primeiro intron (IVS-I) do gene  $\alpha_2$  que remove o sítio de restrição da enzima *HphI* (FOGLIETTA *et al.*, 1996; ZAGO *et al.*, 2005).

Em função da migração populacional, os diversos genótipos causadores de  $\alpha$ -talassemia se encontram dispersos pelo mundo inteiro (**Figura 5**).



**Figura 5** - A distribuição global das  $\alpha$ -talassemias.  $\alpha^T$  - formas não deletionais de  $\alpha$ -talassemia (extraído de WEATHERALL, 2001).

### 1.3.4.2 $\beta$ -talassemia

O complexo do gene  $\beta$  globínico compreende uma região de cerca de 60 Kb do braço curto do cromossomo 11 (11p15.15) onde se localizam cinco genes (5' -  $\epsilon$  -  $\delta$  -  $\beta$  -  $\gamma^G$  -  $\gamma^A$  - 3') dispostos na mesma ordem de sua ativação durante o desenvolvimento ontogenético (ZAGO *et al.*, 2005). A expressão destes genes é controlada por uma região localizada a cerca de 90 Kb acima do gene  $\beta$ , denominada LCR (*locus control region*). O LCR é formado por cinco sítios hipersensíveis à digestão com DNase, a saber HS-1 a HS-5 (THEIN, 1998; HIGGS, 2004; ZAGO *et al.*, 2005).

A sequência do gene beta no cromossomo 11 envolve 1600 bp e codifica 146 aminoácidos, sendo que a região transcrita está contida em três éxons separados por dois introns. Algumas sequências conservadas importantes para a função gênica são encontradas na região promotora 5', nas junções intron-éxon e na região 3' não traduzida (3'-UTR) no final do mRNA (THEIN, 1998; PANIGRAHI & AGARWAL, 2008).

As  $\beta$ -talassemias são heterogêneas ao nível molecular. Mais de 200 mutações já foram identificadas, sendo a maioria, substituições de um único nucleotídeo ou deleções e inserções de oligonucleotídeos levando a mudança na fase de leitura do DNA (mutações *frameshift*) (THEIN, 1998; CAO & GALANELLO, 2010).

As  $\beta^0$ -talassemias, caracterizadas pela ausência completa da produção de cadeias beta, resultam de deleções, mutações no códon de iniciação, mutações sem sentido (*nonsense*), mutações *frameshift* e mutações na região de processamento do RNA (*splicing*). Por outro lado, as  $\beta^+$ -talassemias, caracterizadas pela redução da produção de cadeias beta, são resultantes de mutações na região promotora (ou a região CACCC ou o *TATA box*), no sinal de poliadenilação e nas regiões 5' ou 3' não traduzidas e na região de processamento do RNA (CAO & GALANELLO, 2010).

Ao contrário da  $\alpha$ -talassemia, a  $\beta$ -talassemia raramente é causada por grandes deleções afetando o gene da beta globina. Apenas a deleção de 618 bp na extremidade 3' final do gene  $\beta$  é comum na Índia e Paquistão. Deleções parciais ou totais do LCR podem inativar o gene beta, mesmo deixando-o intacto (PANIGRAHI & AGARWAL, 2008; HIGGS & WEATHERALL, 2009; CAO & GALANELLO, 2010).

Alguns estudos sobre a prevalência das mutações causadoras de  $\beta$ -talassemia foram realizados no Brasil. Entre estes, o de Reichert *et al.* (2008) que investigaram quais as mutações da  $\beta$ -talassemia ocorriam em uma população de 127 indivíduos no Rio Grande do Sul, estado este, que recebeu grande contingente de imigrantes italianos. A mutação mais comum em pacientes com fenótipo de  $\beta^+$ -talassemia foi a IVS-I 110 G>A encontrada em 21 pacientes e, em pacientes com fenótipo de  $\beta^0$ -talassemia, foi a mutação *nonsense* no códon 39, encontrada em 59 indivíduos. Esta frequência foi similar à observada em populações do Mediterrâneo.

Bertuzzo *et al.* (1997), em São Paulo, estudaram 70 pacientes heterozigotos para  $\beta$ -talassemia e observaram que 45 indivíduos possuíam a mutação *nonsense* no códon 39.

Já na região nordeste do Brasil, Araújo *et al.* (2003) observaram que as mutações mais frequentes foram  $\beta^+$ IVS-I-6 (T→C) e  $\beta^0$ IVS-I-1 (G→A). Em recente estudo, conduzido por Silveira *et al.* (2011) no Rio Grande do Norte, foi observado que, dos 31 pacientes heterozigotos para  $\beta$ -talassemia, 13 possuíam a mutação  $\beta^+$ IVS-I-6 e 15 possuíam a mutação  $\beta^0$ IVS-I-1. Em todos os quatro pacientes homozigotos para a  $\beta$ -talassemia foi encontrada a mutação IVS-I-6. Segundo estes pesquisadores, a elevada frequência das mutações IVS-I-6 e IVS-I-1 resulta da contribuição portuguesa na genética da população do Rio Grande do Norte. Estes estudos demonstram a heterogeneidade das mutações causadoras de  $\beta$ -talassemia no Brasil.

#### **1.4 Anemia da doença crônica**

A anemia da doença crônica apresenta três grandes causas clínicas: infecção, inflamação e neoplasia, que são responsáveis por 75% dos casos deste tipo de anemia (FITZSIMONS & BROCK, 2001). Atualmente, a anemia da doença crônica é a anemia mais frequente entre pacientes hospitalizados, particularmente quando se analisam pacientes com idade superior a 65 anos, e é a segunda causa mais frequente de anemia, após a anemia ferropriva. Esta síndrome clínica se desenvolve comumente nos casos de doenças inflamatórias e infecciosas crônicas, câncer, ou doenças autoimunes

(CANÇADO & CHIATTONE, 2002; WEISS, 2002; ROY *et al.*, 2003; MEANS, 2004; RAJ, 2008).

Atualmente, considera-se a ADC, em parte, como uma alteração no metabolismo do ferro causada pela produção de citocinas por células do SRE estimuladas pela resposta inflamatória (MEANS & KRANTZ, 1992; CULLIS, 2011). Diferentes mecanismos contribuem para a ADC, tais como o desvio cinético do ferro da circulação para o armazenamento no SRE, diminuição da eritropoese, baixa produção de eritropoetina em relação ao grau de anemia, associada a uma menor resposta dos precursores eritróides medulares a esta, eritrofagocitose e invasão da medula óssea por patógenos e células tumorais (WEISS, 2005; RAJ, 2008; CULLIS, 2011).

O diagnóstico da ADC é frequentemente considerado um diagnóstico de exclusão. Contudo, existem características que juntamente com um perfil clínico compatível, podem estabelecer o diagnóstico. Na avaliação laboratorial constata-se, geralmente, uma leve a moderada anemia normocítica-normocrômica (WEISS, 2005), podendo nos casos de evolução lenta ou diminuição do conteúdo de ferro corporal total, tornar-se microcítica/hipocrômica (ROY *et al.*, 2003). O RDW geralmente é normal ou apenas levemente aumentado, a diminuição da hemoglobina não chega a níveis tão baixos quanto os da ferropriva, a contagem de reticulócitos é baixa (OLIVEIRA & NETO, 2004).

Em relação aos parâmetros férricos podemos encontrar baixos ou normais o ferro sérico, a saturação de transferrina e as concentrações de transferrina (WEISS, 2005). Os valores de capacidade de ligação total do ferro encontram-se usualmente diminuídos (WONG *et al.*, 1996). Porém, com relação ao ferro sérico, sua diminuição é mais comum, pois a indução de hipoferremia é uma marca característica no desenvolvimento da ADC (WEISS, 2005). Por outro lado, os níveis séricos de ferritina estão normais ou aumentados (WONG *et al.*, 1996; WEISS, 2002; ROY *et al.*, 2003).

### **1.5 Índices para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores**

A microcitose é uma manifestação comumente presente em algumas anemias e constitui importante indicativo para limitar o diagnóstico clínico a quatro condições bem

definidas, sendo estas a deficiência do ferro, as talassemias menores, a ADC e a anemia sideroblástica. Em nosso meio, as anemias microcíticas e hipocrômicas mais comuns são: a anemia ferropriva, ADC e talassemias menores.

Quando o diagnóstico é baseado somente nos parâmetros do hemograma e na morfologia dos eritrócitos, a talassemia menor, usualmente uma anemia microcítica de grau leve a moderado, pode ser diagnosticada erroneamente como anemia ferropriva. Porém, é clinicamente importante diferenciar entre estas duas anemias, uma vez que apresentam patogênese, tratamento e prognóstico inteiramente diferentes. A anemia ferropriva é facilmente corrigida pela suplementação com ferro, enquanto o mesmo tratamento na talassemia menor deveria ser usualmente evitado (LAFFERTY *et al.*, 1996; ELDIBANY *et al.*, 1999; YERMIAHU *et al.*, 1999). Além disso, o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas se torna, muitas vezes, complexo em virtude da concomitância de doenças, além de demandar tempo e apresentar uma investigação laboratorial com custos significativos (TILLYER & TILLYER, 1994; MELO *et al.*, 2002).

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

Vários índices desenvolvidos com esta finalidade podem ser citados, sendo nove testados no presente estudo para a verificação de sua eficiência na distinção entre anemia ferropriva e talassemias menores, a saber: Índice de Mentzer (IM), Índice de Srivastava (ISR), Shine & Lal (SL), Índice do RDW (IRDW), Índice de Green & King (IGK), Índice de Ehsani (IE), Índice de Sirdah (IS), Índice de Ricerca (IR) e um índice desenvolvido em trabalho de Mestrado (MATOS, 2007), denominado Novo Índice (NI), que apresentou grande acurácia na distinção entre anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor (MENTZER, 1973; SRIVASTAVA, 1973; SHINE & LAL, 1977; RICERCA *et al.*, 1987; GREEN & KING, 1989; JAYABOSE *et al.*, 1999; EHSANI *et al.*, 2005; MATOS, 2007; SIRDAH *et al.*, 2008). As fórmulas e os valores de *cut-off* destes índices são descritos na **Tabela 2** da seção Material e Métodos.

### **1.5.1 Novo Índice**

Uma fórmula matemática para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores foi desenvolvida em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007) em parceria com o Serviço de Estatística da UFMG. Os valores de todos os parâmetros hematimétricos dos pacientes envolvidos no referido estudo (23 pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia menor e 83 pacientes portadores de anemia ferropriva) foram encaminhados ao Serviço de Estatística da UFMG no intuito de verificar o possível estabelecimento de um novo índice para diferenciação entre anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor. Além disso, esperava-se que tal fórmula discriminante apresentasse grandes percentuais de sensibilidade e especificidade, preferencialmente superiores ao Índice de Green & King, o qual mostrou maior eficiência dentre os índices testados por ocasião do referido estudo.

Para a criação deste novo índice foram empregadas a Análise de Discriminante de Fisher (linear) e a análise discriminante não linear além da plotagem da curva ROC (*Receiver Operator Characteristic Curve*). A Análise de Discriminante é uma técnica utilizada para a classificação dos elementos de uma amostra ou população. Para a sua aplicação, é necessário que os grupos para os quais cada elemento amostral pode ser classificado, sejam bem definidos e conhecidos *a priori*, de acordo com suas características gerais. Com isso, o conhecimento sobre os grupos permite a elaboração de uma função matemática, fundamentada na teoria das probabilidades, para classificar um novo elemento (Maiores detalhes do desenvolvimento do Novo Índice utilizando a Análise de Discriminante podem ser obtidos no Anexo A).

Algumas medidas de acurácia e suas propriedades, entre estas o poder discriminativo, são utilizadas para diferenciar entre modelos distintos que estão avaliando os mesmos resultados, ou entre diferentes versões do mesmo modelo prognóstico. O poder discriminativo de um modelo é a sua habilidade de distinguir de forma precisa entre aqueles indivíduos que se apresentam ou não com um determinado resultado. A discriminação pode ser avaliada por muitos métodos incluindo sensibilidade, especificidade, valores preditivos, razão de verossimilhança e a área sob a curva ROC.

A curva ROC constitui um método estatístico gráfico que avalia a acurácia diagnóstica de um marcador (teste diagnóstico) para distinguir entre duas populações. Esta curva é uma técnica indicada para escolher os pontos de corte (*cut-offs*) mais adequados de um determinado teste, segundo seus níveis de sensibilidade e especificidade. O melhor valor de *cut-off* é o ponto na curva ROC onde a combinação de sensibilidade e especificidade são máximas. Basicamente, a área sob a curva ROC reflete a probabilidade com que um modelo prognóstico discriminará corretamente entre dois indivíduos quando um deles tem o evento em questão e o outro não. A área sob a curva ROC é um valor que varia entre zero e um. Um valor de 0,50 significa que o modelo proposto não pode discriminar melhor do que qualquer ferramenta usada de maneira aleatória; enquanto o valor de um (1) representa uma perfeita discriminação. Um marcador biológico que possui uma área sob a curva ROC de um (1) diferenciará perfeitamente indivíduos doentes (sensibilidade igual a um) dos saudáveis (especificidade igual a um) (HANLEY & MCNEIL, 1982; MARGOLIS *et al.*, 2002; FLUSS *et al.*, 2005; PERKINS & SCHISTERMAN, 2006).

Um requisito para a utilização da função discriminante de Fisher é que as variáveis indicadas para compor o índice tenham distribuição normal nos dois grupos de pessoas separadamente e que a distribuição conjunta destas variáveis seja normal multivariada. Contudo, foi decidido trabalhar com todas as variáveis do hemograma uma vez que o tamanho da amostra foi pequeno e, portanto, sensível a qualquer desvio mínimo da normalidade ou valor extremo, além da perspectiva de validar a nova fórmula utilizando um banco maior de dados. Desta forma, foram realizadas todas as combinações possíveis entre as variáveis do hemograma. Posteriormente, foi plotada a curva ROC e, baseando-se na maior área sob a curva, a fórmula com melhor desempenho foi aquela que levou em consideração os parâmetros número de hemácias e CHCM.

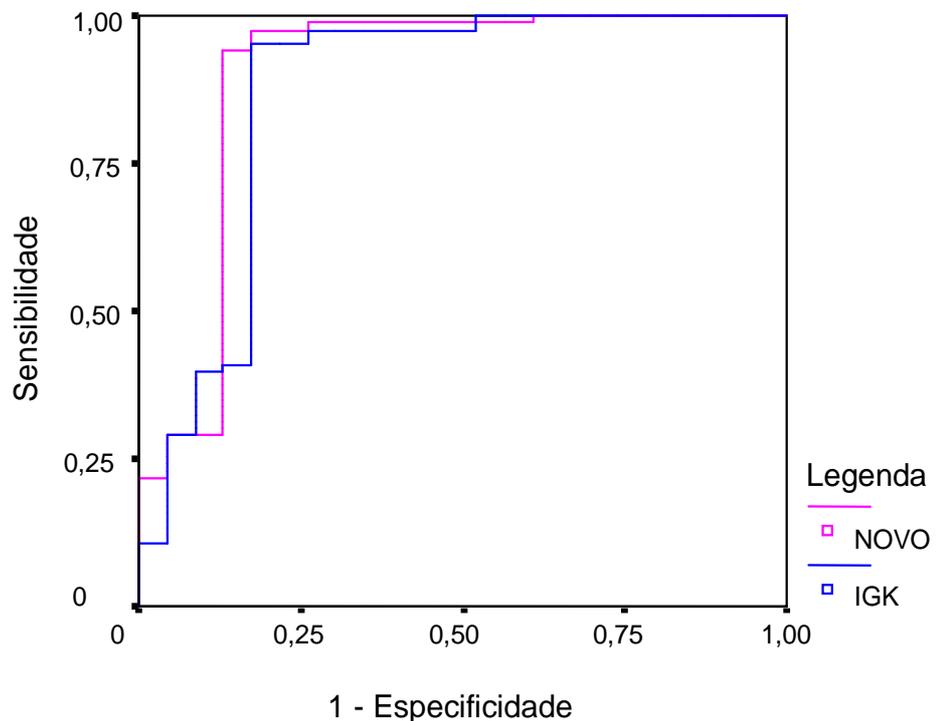
Finalmente, o índice final ajustado apresentou a seguinte fórmula:

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

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

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

Com o objetivo de fazer uma comparação mais refinada do índice obtido com o já conhecido IGK, foi feita a curva ROC para os dois índices usando o programa SPSS 12.0.1 (**Figura 6**). Aquele índice que apresenta maior área sob a curva é o que melhor discrimina os dois grupos.



**Figura 6** - Curvas ROC para o Índice de Green & King (IGK) e o Novo Índice.

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

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da anemia não ser considerada uma condição clínica grave pela maioria dos médicos, esta é mais comum do que se imagina (GOODNOUGH & NISSENSON, 2004). As anemias se tornam, assim, um grande problema de saúde pública. Como exemplos, a anemia ferropriva cuja prevalência em diferentes regiões do mundo varia de 12 a 43% e a ADC, muito frequente entre pacientes hospitalizados (BREYMAN, 2002; WEISS, 2002). A deficiência de ferro é a mais comum das alterações nutricionais na infância, não apenas nas nações em desenvolvimento, mas também em países altamente industrializados (COUTINHO *et al.*, 2005). Os números são assustadores: 2 bilhões de pessoas (em torno de 30% da população mundial) são anêmicos, principalmente devido à deficiência do ferro, situação frequentemente exacerbada pela malária e algumas doenças parasitárias em países em desenvolvimento (WHO, 2012). Além disso, a deficiência do ferro possui importante impacto funcional em humanos por trazer também consequências econômicas, tais como menor habilidade cognitiva nas crianças e diminuição da capacidade de trabalho em adultos (HORTON & ROSS, 2003; WHO, 2012).

Da mesma forma, as talassemias constituem os distúrbios genéticos mais comuns no mundo inteiro, causando também um grande problema de saúde pública. A melhor estimativa disponível indica que 250 milhões, correspondentes a 4,5% da população mundial, são heterozigotos para um defeito no gene da globina (TUZMEN & SCHECHTER, 2001). Torna-se, assim, de grande importância um estudo de caracterização de tais anemias, na tentativa de se otimizar o diagnóstico diferencial entre estas utilizando-se, se possível, apenas um hemograma. A possibilidade de simplificação do diagnóstico se reveste de particular importância considerando que grande parcela da população não dispõe de recursos para exames mais detalhados, ou ainda, que não tenham sido solicitados pela clínica médica. Com esta finalidade, a utilização de várias fórmulas derivadas de parâmetros disponíveis em contadores automáticos tem sido proposta (GREEN & KING, 1989; SIRDAH *et al.*, 2008).

Desta forma, a expectativa de que um estudo minucioso sobre os vários índices que se valem dos parâmetros do rotineiro hemograma e, em especial, de um Novo Índice (MATOS, 2007) pudesse propiciar um direcionamento na distinção entre talassemias menores e anemia ferropriva, tanto em laboratórios clínicos como na prática médica, interferindo positivamente no diagnóstico e tratamento dos pacientes, motivou o desenvolvimento deste trabalho. Dessa forma, gastos adicionais poderiam ser evitados e o tratamento seria direcionado a cada uma das anemias.

Outra questão a ser respondida é a prevalência de  $\alpha$ -talassemia em nosso meio. Originalmente, as  $\alpha$ -talassemias eram endêmicas apenas nas regiões tropicais e subtropicais atingidas pela malária, mas a recente migração de pessoas destas áreas resultou numa disseminação mundial desta doença (LIU *et al.*, 2000). A população brasileira apresenta alto grau de mistura racial entre descendentes europeus, africanos, indígenas e asiáticos, o que traz elevadas frequências de alterações da hemoglobina que refletem a diversidade de origens raciais em cada região do país (ZAGO & COSTA, 1985). No Brasil, a frequência da  $\alpha_2$ -talassemia causada pela deleção de 3.7 Kb varia de 20 a 25% na população afro-descendente (SONATI *et al.*, 1991). Em trabalho posterior, foi observada, na Bahia, uma frequência de 22,2% de  $-\alpha^{3.7}$  (ADORNO *et al.*, 2005).

O estudo realizado por Borges *et al.* (2001) demonstrou que a  $\alpha$ -talassemia, principalmente devido à deleção de 3.7 Kb, é uma importante causa de microcitose e hipocromia em indivíduos sem anemia. Foi observado que a população negra brasileira não anêmica possui 70,4% de probabilidade de ser carreadora de  $\alpha$ -talassemia e que entre caucasianos brasileiros a chance é de 41,5%, um percentual ainda considerado elevado. Orlando *et al.* (2000) observaram que em 262 doadores de sangue recrutados em São José do Rio Preto, São Paulo, o traço talassêmico  $\alpha$  e  $\beta$  estava presente em 1,90 e 0,38% desta população, respectivamente, porém, o referido estudo não contemplou análise molecular. Segundo Modell & Darlison (2008), no mínimo 20% da população mundial é carreadora de  $\alpha^+$ -talassemia.

Estudos descritos na literatura, valendo-se de técnicas de biologia molecular, têm relatado que a frequência de  $\alpha$ -talassemia em nosso país é bastante elevada (SONATI *et al.*, 1991; BORGES *et al.* 2001; WAGNER *et al.* 2010). Por experiência pessoal e por

meio de comunicações pessoais, não temos observado a frequência relatada pela literatura, por métodos convencionais. Assim, tal fato merece uma minuciosa investigação, principalmente em Minas Gerais que constitui um estado com grande contingente de afrodescendentes. Estas populações, em teoria, possuem maior possibilidade de apresentar o traço  $\alpha$ -talassêmico considerando suas origens étnicas.

Por outro lado, é comum o encontro de indivíduos que relatam persistente anemia microcítica e hipocrômica leve e não responsiva ao ferro, sem evidência de qualquer outro sinal atribuível às doenças crônicas. Estas características levantam forte suspeita de serem portadores de  $\alpha$  ou  $\beta$ -talassemia, cujo diagnóstico não é confirmado. Então, a baixa prevalência de  $\alpha$ -talassemia poderia ser justificada por uma subestimativa da hemoglobina H devido a bandas tão tênues que não permitem identificação visual na eletroforese, bem como pela impossibilidade de detecção de inclusões desta hemoglobina coradas por corante supravital.

Diante do exposto acima, surgem alguns questionamentos:

- Existem erros pré-analíticos ou analíticos que inviabilizam um resultado compatível com a  $\alpha$ -talassemia?
- Os métodos convencionais disponíveis no laboratório clínico para diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia são significativamente sensíveis para detectar este distúrbio em suas formas menores?

O fato de  $\alpha$ -talassemia não ser diagnosticada dentro do amplo espectro de anemias microcíticas e hipocrômicas em nosso meio, em contraposição aos dados de outros estudos e aos fatores epidemiológicos existentes, nos remeteu a uma duplicidade de hipóteses envolvendo o uso de métodos laboratoriais inadequados (com baixa sensibilidade) ou o uso de amostra também inadequada (amostra não recente), ou ainda, pode estar indicando uma frequência muito baixa da doença em nosso meio.

A potencialidade de utilização dos conhecimentos gerados pelo presente estudo, aliado às incertezas sobre o diagnóstico laboratorial das  $\alpha$ -talassemias bem como os aspectos contraditórios entre os relatos da literatura e as observações pessoais, serviram de subsídios e de incentivo para a realização do presente estudo.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o desempenho de um Novo Índice (NI) na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores, utilizando métodos hematológicos convencionais e moleculares como referências nesta avaliação; bem como diagnosticar, através destes métodos, os casos de  $\alpha$ -talassemia em um grupo de pacientes atendidos em dois hospitais públicos de Minas Gerais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Caracterizar as principais mutações da  $\alpha$ -talassemia em nosso meio, utilizando os resultados como padrão-ouro no diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia.
- 2) Investigar o poder de discriminação de nove índices citados na literatura, entre estes o de Green & King (1988), para o diagnóstico diferencial entre anemia ferropriva e talassemias menores.
- 3) Determinar a acurácia do Novo Índice (NI) para a confirmação do diagnóstico de  $\alpha$  e  $\beta$ -talassemias do tipo menor, diferenciando-as da anemia ferropriva.
- 4) Determinar o grau de concordância entre os métodos convencionais e a aplicação dos índices para o diagnóstico das talassemias menores.
- 5) Determinar o grau de concordância entre os métodos convencionais e métodos moleculares para o diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Aspectos éticos**

Este estudo foi aprovado nos Comitês de Ética das seguintes Instituições: Universidade Federal de Minas Gerais (Parecer 344/09 - Anexo B), Hospital das Clínicas (Parecer 114/09 - Anexo C) e Hospital Governador Israel Pinheiro (Parecer 129/09 - Anexo D).

### **4.2 Casuística**

#### **4.2.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1)**

Este grupo foi composto de 30 pacientes adultos os quais apresentavam VCM abaixo de 80 fL, com características clínicas e laboratoriais sugestivas de  $\alpha$ -talassemia, e pacientes que apresentavam, além de VCM abaixo de 80 fL, eletroforese de hemoglobina com padrão HbAA<sub>2</sub> e dosagem de HbA<sub>2</sub> acima de 3,5% (ZAGO *et al.*, 2005), quadro compatível com  $\beta$ -talassemia menor. Estes pacientes foram recrutados no Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas em Belo Horizonte – MG. Todos os pacientes portadores de doenças malignas e inflamatórias/infecciosas foram excluídos deste grupo, com base em dados clínicos e informações pessoais obtidas por preenchimento de ficha clínica (Apêndice A).

Foram obtidos 5 mL de sangue venoso em EDTA, após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B). Esta amostra de sangue foi utilizada para o estudo genético.

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos através dos prontuários dos pacientes, incluindo resultados da dosagem de ferritina (método: Quimioluminescência; aparelho Immulite<sup>®</sup> da DPC<sup>®</sup>), eletroforese de hemoglobina em pH alcalino (método: eletroforese em pH 8,6 utilizando sistema semi-automatizado Hydrasys<sup>®</sup> da Sebia<sup>®</sup>), dosagem de HbA<sub>2</sub> (método da eluição da fita eletroforética com determinação relativa dos diversos tipos de hemoglobinas), dosagem de HbF (método de Betke), contagem de reticulócitos (coloração de azul de cresil brilhante), pesquisa de HbH (coloração de azul de cresil brilhante) e hemograma (contador automático Sysmex<sup>®</sup> XE-2100 da

Sysmex<sup>®</sup>). Os dados referentes ao hemograma foram utilizados para validação do Novo Índice (MATOS, 2007).

#### **4.2.2 Pacientes do IPSEMG (Grupo 2)**

Neste grupo, foram avaliados 197 pacientes, com idade superior a 18 anos, apresentando hemoglobina inferior a 12 g/dL e 13 g/dL para mulheres e homens, respectivamente, VCM abaixo de 80 fL e ferritina inferior a 6 ng/mL para mulheres e 28 ng/mL para homens (kit *Ferritin*, Access<sup>®</sup>), recrutados no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) em Belo Horizonte - MG. Todos os pacientes portadores de doenças malignas e inflamatórias/infecciosas foram excluídos deste grupo.

Foram obtidos 5 mL de sangue venoso em EDTA que foram utilizados para a análise molecular. Os participantes deste grupo não assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido conforme dispensa concedida pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Governador Israel Pinheiro, porquanto foi utilizado apenas o refugo das amostras dos pacientes selecionados, sem necessidade de coleta adicional de sangue.

Além da amostra de sangue venoso, também foram obtidos os resultados do hemograma (contador automático ABX Pentra DX-DF 120 da Horiba Medical<sup>®</sup>) e ferritina (método: Quimioluminescência; aparelho Access<sup>®</sup> Immunoassay System da Beckman Coulter<sup>®</sup>) destes indivíduos. Os dados referentes ao hemograma foram utilizados para validação do Novo Índice (MATOS, 2007).

#### **4.3 Extração de DNA a partir de sangue total**

O DNA foi extraído a partir de células leucocitárias obtidas de sangue total coletado em EDTA, utilizando-se o Kit Gentra Puregene Blood (QIAGEN) seguindo as recomendações do fabricante com pequenas modificações (Apêndice C). As amostras de DNA extraído foram armazenadas no freezer a – 80°C para posterior pesquisa das mutações.

#### 4.4 Protocolo para estudo das mutações

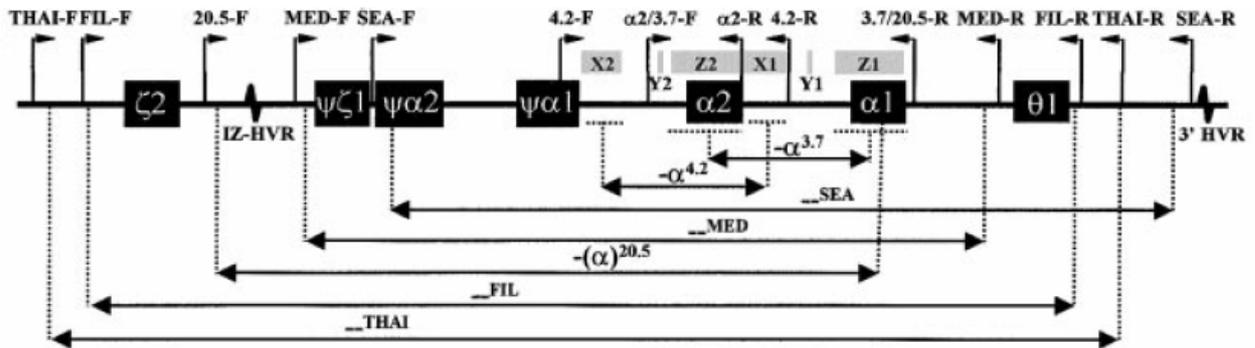
A análise molecular compreendeu a detecção das principais mutações deletionais e não-deletionais, segundo a frequência relatada em trabalhos epidemiológicos sobre  $\alpha$ -talassemia publicados.

A investigação das mutações deletionais 3.7, 4.2, MED, 20.5, SEA, FIL e THAI foi realizada pela técnica de PCR Multiplex na qual várias regiões do DNA são amplificadas simultaneamente. O protocolo utilizado para a reação (Apêndice D) foi otimizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG de acordo com a metodologia descrita por Tan *et al.* (2001) sendo utilizados oligonucleotídeos sintetizados pela Promega®, cujas sequências (**Tabela 1**) também foram descritas pelos mesmos pesquisadores. A reação para a detecção de tais mutações deletionais (3.7, 4.2, 20.5, SEA, THAI, FIL e MED) possui um controle para verificação do sucesso da amplificação, o gene LIS1 localizado no cromossomo 17. Após a amplificação, o produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

O protocolo para a detecção da mutação  $\alpha^{HphI}$  (Apêndice E) foi padronizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Farmácia da UFMG de acordo com a metodologia de Foglietta *et al.* (1996). Para a análise da mutação não deletional  $\alpha^{HphI}$ , o produto da amplificação gênica após a PCR foi digerido pela enzima de restrição *HphI* em uma reação de PCR-RFLP segundo o protocolo de digestão descrito no Apêndice E. O produto da digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

As reações de PCR para a detecção das mutações deletionais foram realizadas no termociclador MJ96+ (Biocycler), enquanto as reações para a detecção da mutação não deletional *HphI* foram realizadas no termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.).

A extensão das sete deleções e as posições relativas dos oligonucleotídeos estão representadas na **Figura 7**.



**Figura 7** - Representação esquemática do grupamento do gene  $\alpha$  globínico indicando a extensão de sete deleções e as posições relativas dos *primers*. A localização das sequências homólogas X, Y e Z e das regiões hipervariáveis (HVRs) também estão representadas (extraído de TAN *et al.*, 2001).

**Tabela 1**- Sequências dos *primers* utilizados para a detecção das mutações deletionais e não deletionais da  $\alpha$ -talassemia.

Deleção	Primer	Sequência 5' → 3' do Primer	Concentração do Primer	Referência Bibliográfica
3.7	$\alpha_2/3.7$ -F	CCCCTCGCCAAGTCCACCC	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
4.2	4.2-F	GGTTTACCCATGTGGTGCCTC	0,5 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	4.2-R	CCCGTTGGATCTTCTCATTCCC	0,5 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
SEA	SEA-F	CGATCTGGGCTCTGTGTCTC	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	SEA-R	AGCCACGTTGTGTCATGGC	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
FIL	FIL-F	TTTAAATGGGCAAAACAGGCCAGG	1,0 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	FIL-R	ATAACCTTTATCTGCCACATGTAGC	1,0 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
THAI	THAI-F	GACCATTCTCAGCGTGGGTG	0,3 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	THAI-R	CAAGTGGGCTGAGCCCTTGAG	0,3 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
MED	MED-F	TACCCTTTGCAAGCACACGTAC	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	MED-R	TCAATCTCCGACAGCTCCGAC	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
20.5	20.5-F	GCCCAACATCCGGAGTACATG	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
	3.7/20.5-R	AAAGCACTCTAGGGTCCAGCG	0,2 $\mu$ M	TAN <i>et al.</i> , 2001
HphI	L	TCCCCACAGACTCAGAGAGAACC	18 pM	FOGLIETTA <i>et al.</i> , 1996
	D	AACACCTCCATTGTTGGCACATTCC	18 pM	FOGLIETTA <i>et al.</i> , 1996

#### 4.5 Aplicação de índices discriminativos entre anemia ferropriva e talassemias menores

Foram calculados e interpretados os valores de nove índices discriminativos utilizando as fórmulas e os valores de *cut-off* descritos na **Tabela 2**.

**Tabela 2** – Fórmulas e valores de *cut-off* para nove índices de discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor.

Índice	Fórmula	Valor de <i>cut-off</i>
IGK	$[(VCM)^2 \times RDW] / (Hb \times 100)$	AF > 72 Tal < 72
NI	$1,91 \times Hm + 0,44 \times CHCM$	AF < 23,85 Tal > 23,85
ISR	HCM/Hm	AF > 3,8 Tal < 3,8
IRDW	$VCM \times RDW / Hm$	AF > 220 Tal < 220
SL	$(VCM)^2 \times HCM$	AF > 1530 Tal < 1530
IM	VCM/Hm	AF > 13 Tal < 13
IE	$VCM - 10 \times Hm$	AF > 15 Tal < 15
IS	$VCM - Hm - 3 \times Hb$	AF > 27 Tal < 27
IR	RDW/Hm	AF > 4,4 Tal < 4,4

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

#### 4.5 Análise Estatística

A verificação de normalidade dos parâmetros hematológicos foi realizada utilizando o *software* Minitab 14, Teste de Anderson-Darling.

A análise estatística para investigar a presença de diferença significativa entre os parâmetros hematológicos dos três grupos de pacientes (anemia ferropriva, anemia ferropriva em concomitância com talassemia menor e talassemia menor) foi realizada utilizando o *software* Prisma 5 e teste de Kruskal-Wallis seguido da aplicação do teste de Dunn's. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

Com a finalidade de investigar o desempenho dos índices acima foram calculados os valores de sensibilidade, especificidade, eficiência, índice de Youden segundo as fórmulas abaixo:

- Sensibilidade = verdadeiro positivo/(verdadeiro positivo + falso negativo)
- Especificidade = verdadeiro negativo/(verdadeiro negativo + falso positivo)
- Eficiência = (verdadeiro positivo + verdadeiro negativo)/(verdadeiro positivo + verdadeiro negativo + falso positivo + falso negativo)
- Índice de Youden = (sensibilidade + especificidade) - 100

A sensibilidade é definida como a probabilidade de o teste ser positivo sabendo-se que o paciente examinado é doente, ou seja, mede a capacidade de reatividade do teste em um paciente doente. A especificidade se refere à probabilidade de o teste ser negativo sabendo-se que o paciente examinado não é portador da doença, ou seja, a não reatividade do teste em pacientes não portadores da doença. Com relação ao parâmetro eficiência, este mostra que um teste eficiente diagnostica como positivo os verdadeiros positivos e como negativo os verdadeiros negativos (PEKKANEN & PEARCE, 1999; SOARES & SIQUEIRA, 2002).

Outro parâmetro calculado foi o índice de Youden que fornece uma apropriada medida da validade de uma técnica ou determinada questão. Este índice depende da sensibilidade e especificidade, não levando em consideração os valores preditivos positivo e negativo, uma vez que estes valores estão estreitamente relacionados com a prevalência da doença analisada. Assim, o índice de Youden se mostra o mais

imparcial na medida do efeito. O índice de Youden é obtido somando-se os valores de sensibilidade e especificidade e subtraindo-se desta soma 100. Um valor para tal índice próximo a zero sugere que o método utilizado não é melhor que qualquer técnica usada ao acaso (PEKKANEN & PEARCE, 1999; DEMIR *et al.*, 2002; ALFADHLI *et al.*, 2006).

Além do cálculo destes parâmetros, as curvas ROC das fórmulas discriminantes foram plotadas e determinadas suas respectivas áreas utilizando o *software* Prisma 5. A maior área sob a curva indica o índice com maior probabilidade de discriminar corretamente os pacientes portadores de uma das referidas anemias. A comparação das áreas foi realizada utilizando a técnica de simulação por reamostragem denominada *Bootstrap*. O conceito geral de *Bootstrap* é que se for aceito que uma amostra é a melhor informação disponível sobre uma população estatística, é possível simular uma nova coleta de dados reamostrando os elementos da amostra, com reposição.

Finalmente, para a verificação da concordância do diagnóstico obtido por meio da aplicação dos índices com o diagnóstico realizado através dos exames padrão-ouro foi calculado o coeficiente *Kappa* utilizando-se o *software* OpenEpi versão 2.3.1. A interpretação de *Kappa* foi de acordo com a seguinte escala: 1,00-0,81 excelente; 0,80-0,61, bom; 0,61-0,40, moderado; 0,40-0,21, fraco; 0,20-0,0 ausência de concordância (SZKLO & NIETO, 2000), quando comparado ao padrão-ouro de diagnóstico de talassemia menor e anemia ferropriva.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Avaliação das mutações causadoras de $\alpha$ -talassemia

#### 5.1.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1)

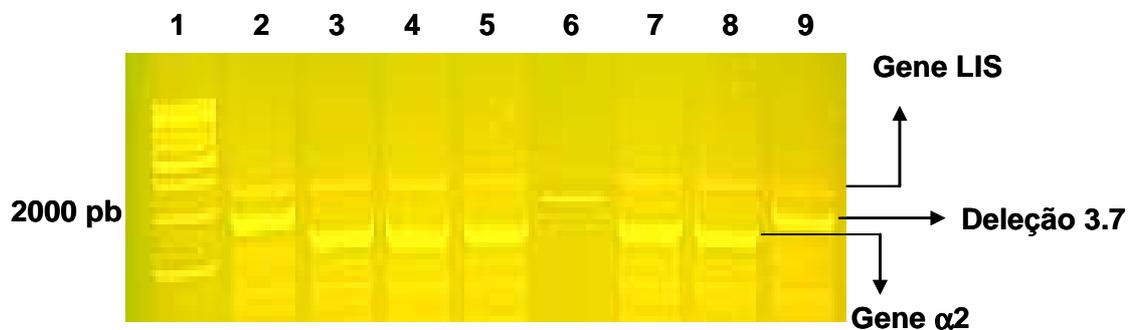
O grupo 1 representa os pacientes que, clinicamente, são diagnosticados por exclusão como supostos portadores de  $\alpha$ -talassemia após avaliação do metabolismo do ferro e realização de exames convencionais para avaliação de anemia hemolítica. Além destes, foram incluídos pais de pacientes menores de 18 anos diagnosticados como  $\alpha$ -talassêmicos pelos exames convencionais e, também, portadores de  $\beta$ -talassemia menor comprovada por eletroforese de hemoglobina e dosagem de HbA<sub>2</sub>.

Neste grupo foram obtidas amostras de 30 pacientes juntamente com os resultados de ferritina sérica, pesquisa de HbH, contagem de reticulócitos, eletroforese de hemoglobina, dosagem de HbA<sub>2</sub> e HbF solicitados pelo clínico.

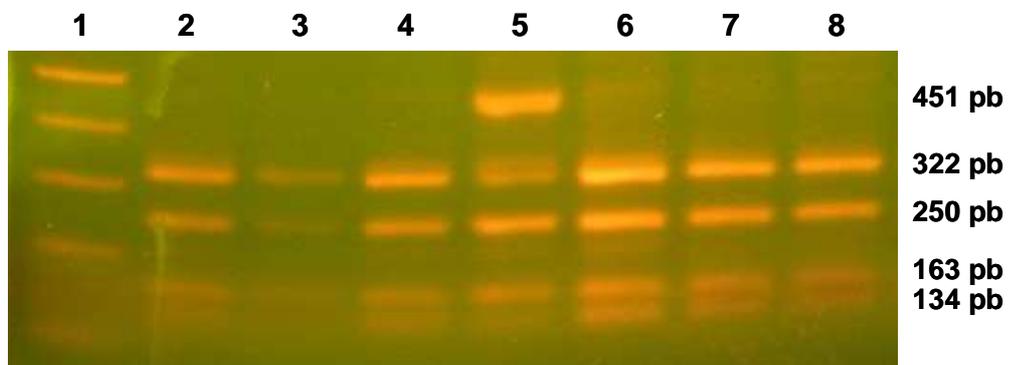
Nos 30 pacientes deste grupo, 24 eram portadores de  $\beta$ -talassemia menor. Os demais eram pacientes supostamente portadores de  $\alpha$ -talassemia em sua forma menor. Neste grupo, a deleção 3.7 foi encontrada em homozigose em cinco destes (16,7%). Já a mutação não delecional HphI foi observada em apenas um (3,3%) paciente em heterozigose (**Tabela 3**). É importante ressaltar que, a pesquisa de HbH por coloração supravital foi negativa e a eletroforese de hemoglobina normal para todos estes pacientes portadores de mutações causadoras de  $\alpha$ -talassemia, revelando a baixa concordância dos métodos hematológicos convencionais com o método molecular de diagnóstico.

A **Figura 8** ilustra os resultados obtidos para a identificação das mutações 3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, FIL e THAI utilizando-se a técnica de PCR Multiplex. O tamanho dos fragmentos esperados para as mutações 3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, FIL, THAI e para os genes  $\alpha_2$  e LIS são, respectivamente, 2022 pb, 1628 pb, 1007 pb, 807 pb, 1349 pb, 546 pb, 1153 pb, 1800 pb e 2350 pb. É importante ressaltar que foram utilizadas amostras sabidamente positivas para estas deleções, como controle da reação e padronização da técnica.

A **Figura 9** ilustra os resultados obtidos para a identificação da mutação não deletional *HphI*. O produto da PCR, que compreende o gene  $\alpha_2$ , possui 880 pb, e é subdividido em fragmentos de 134, 322, 250, 163 e 11 pb quando incubado com a enzima *HphI*, sendo que o último não é visualizado após corrida eletroforética. No caso do gene  $\alpha_2$  com a deleção de cinco nucleotídeos, serão gerados fragmentos de 451, 250, 163 e 11 pb (deleção de cinco nucleotídeos), devido à perda do sítio de restrição da enzima *HphI* na posição 134.



**Figura 8** – Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, dos produtos de PCR Multiplex para identificação das mutações 3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, FIL e THAI. Canaleta 1 – padrão de peso molecular (1 Kb); canaletas 2, 6 e 9 – genótipo 3.7/3.7; canaletas 3, 4, 5, 7 e 8 – genótipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ .



**Figura 9** - Eletroforese em gel de agarose a 1,5%, dos produtos de PCR após a digestão com a enzima *HphI* para a identificação da mutação não deletional *HphI*. Canaleta 1 - padrão de peso molecular (1 Kb); canaletas 2, 3, 4, 6, 7 e 8 - genótipo  $\alpha\alpha/\alpha\alpha$ ; canaleta 5 - genótipo  $\alpha\alpha/\alpha^{\text{HphI}}\alpha$ .

### 5.1.2 Pacientes IPSEMG (Grupo 2)

Foram coletadas amostras de 197 pacientes portadores de anemia ferropriva confirmada através da dosagem de ferritina sérica e realizada a sua tipagem para a

presença das mutações delecionais 3.7, 4.2, 20.5, MED, SEA, Thai e Fil e para a mutação não delecional HphI. Todas as amostras foram provenientes do serviço ambulatorial do Hospital, no qual são atendidos pacientes realizando exames de rotina.

Entre os 197 pacientes do grupo comprovadamente portador de anemia ferropriva, 42 pacientes apresentavam  $\alpha$ -talassemia concomitantemente, comprovada através dos exames moleculares, sendo que em 41 (20,8%) destes foi detectada a mutação delecional 3.7 observada em homozigose em três (1,5%) pacientes e em heterozigose em 38 (19,3%) indivíduos. A mutação não delecional HphI foi encontrada em apenas um (0,5%) paciente em heterozigose (**Tabela 3**).

**Tabela 3 – Avaliação do número de pacientes carreadores das mutações 3.7 e HphI associadas à  $\alpha$ -talassemia pesquisada nos pacientes portadores de anemia ferropriva atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e nos portadores de talassemia menor atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC).**

	AF (n=197)	Tal (n=30)	Total (n=227)
Deleção 3.7	41 (20,8%)	5 (16,7%)	46 (20,3%)
Homozigotos 3.7	3 (1,5%)	5 (16,7%)	8 (3,5%)
Heterozigotos 3.7	38 (19,3%)	0	38 (16,7%)
HphI	1 (0,5%)	1 (3,3%)	2 (0,9%)
Homozigotos HphI	0	0	0
Heterozigotos HphI	1 (0,5%)	1 (3,3%)	2 (0,9%)

AF - anemia ferropriva, Tal - talassemia menor.

## **5.2 Caracterização dos pacientes**

Após a pesquisa das mutações, os dois grupos de pacientes foram caracterizados quanto à média de idade e sexo.

### **5.2.1 Pacientes do Hospital das Clínicas (Grupo 1)**

Neste grupo foram obtidas amostras de 30 pacientes sendo que destes, 10 (33,3%) eram do sexo masculino e 20 (66,7%) do sexo feminino. A idade variou de 18 a 81 anos, com uma média de 47,2 anos (**Tabela 4**).

### **5.2.2 Pacientes do IPSEMG (Grupo 2)**

Neste grupo constituído por 197 pacientes, 17 (8,6%) eram do sexo masculino e 180 (91,4%) do sexo feminino. A idade variou de 18 a 89 anos, com uma média de 48,2 anos (**Tabela 4**). Para uma melhor caracterização dos pacientes, este grupo foi subdividido em dois grupos: um primeiro grupo de pacientes portadores unicamente de anemia ferropriva (AF) e um segundo grupo de pacientes portadores de anemia ferropriva e talassemia menor (AF + Tal) comprovada por métodos moleculares. No subgrupo AF, composto por 155 pacientes, 13 (8,4%) eram do sexo masculino e 142 (91,6%) do sexo feminino. A idade variou de 18 a 89 anos, com uma média de 49 anos. No subgrupo AF + Tal, formado por 42 pacientes, 4 (9,5%) eram do sexo masculino e 38 (90,5%) do sexo feminino. A idade variou de 19 a 82 anos, com uma média de 45,3 anos.

**Tabela 4 - Caracterização dos pacientes portadores de anemia ferropriva (AF total) e seus subgrupos: somente anemia ferropriva (AF) e anemia ferropriva + talassemias menores (AF + Tal) atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e talassemias menores (Tal) atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC), com relação à média de idade (idades mínima e máxima) e ao sexo.**

	Idade (anos)	Sexo		Total
		Masculino	Feminino	
AF total	48,2 (18-89)	17 (8,6%)	180 (91,4%)	197
AF	49 (18-89)	13 (8,4%)	142 (91,6%)	155
AF + Tal	45,3 (19-82)	4 (9,5%)	38 (90,5%)	42
Tal	47,2 (18-81)	10 (33,3%)	20 (66,7%)	30

AF - anemia ferropriva, Tal - talassemias menores.

### 5.3 Análise de parâmetros hematimétricos

Posteriormente à caracterização dos pacientes dos três grupos segundo idade e sexo, foi realizada uma análise estatística de vários parâmetros do hemograma obtidos dos contadores automáticos existentes nos laboratórios dos dois hospitais IPSEMG e Hospital das Clínicas. Esta análise teve como objetivo verificar possíveis diferenças significativas que pudessem caracterizar os grupos anemia ferropriva, talassemia menor e a concomitância anemia ferropriva e talassemia menor quanto aos parâmetros hematológicos. Foram analisados os seguintes parâmetros do hemograma: número de hemácias (Hm), hemoglobina (Hb), volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), índice de anisocitose eritrocitária (RDW) e o número de plaquetas.

Após a aplicação de teste de normalidade foi observado que todos os parâmetros foram não paramétricos. Na **Tabela 5** encontram-se os valores dos vários parâmetros hematológicos levados em consideração na análise estatística.

**Tabela 5 – Parâmetros hematológicos dos pacientes portadores de anemia ferropriva (AF), anemia ferropriva e talassemias menores (AF + Tal) atendidos no Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG) e apenas talassemias menores (Tal) atendidos no Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas (HC). Os dados foram apresentados como mediana e intervalo interquartis.**

Parâmetros	AF (n=155)	AF + Tal (n=42)	Tal (n=30)
Hm ( $10^6/\mu\text{L}$ )	4,45 (4,18; 4,71)	4,60 (4,28; 4,94)	5,40 (5,09; 5,72) <sup>a, b</sup>
Hb (g/dL)	10,0 (9,3; 10,7)	10,5 (9,5; 11,1)	10,9 (10,5; 11,8) <sup>a, b</sup>
Ht (%)	32,2 (30,3; 33,8)	33,0 (31,0; 35,0)	34,6 (33,2; 36,2) <sup>a, b</sup>
VCM (fL)	73,0 (67,0; 76,0)	72 (69,0; 76,0)	63,8 (61,6; 68,5) <sup>a, b</sup>
HCM (pg)	22,7 (20,8; 24,1)	23,0 (21,0; 23,9)	20,4 (19,7; 21,6) <sup>a, b</sup>
CHCM (g/dL)	31,2 (30,4; 31,8)	31,5 (30,4; 32,4)	31,8 (31,2; 32,6) <sup>a</sup>
RDW (%)	17,9 (16,6; 19,4)	18,5 (16,2; 19,9)	15,9 (15,3; 16,9) <sup>a, b</sup>
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ )	319,0 (257,0; 390,0)	312,5 (259,0; 352,0)	233,5 (197,5; 275,3) <sup>a, b</sup>

Hm - número de hemácias, Hb - hemoglobina, Ht - hematócrito, VCM - volume corpuscular médio, HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média, RDW - índice de anisocitose eritrocitária, a - diferença significativa com o grupo AF, b - diferença significativa com o grupo AF + Tal.

Dentre os parâmetros hematológicos analisados, observou-se que nenhum destes apresentou diferença entre o grupo de pacientes portador unicamente de anemia ferropriva do grupo com concomitância de doenças. Na comparação entre o grupo anemia ferropriva e talassemia menor, todos os parâmetros analisados mostraram diferença. No caso da comparação entre talassemia menor e o grupo com concomitância, foi observado que apenas o parâmetro CHCM não apresentou diferença entre estes grupos.

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

Várias fórmulas descritas na literatura foram avaliadas quanto à sua eficiência na distinção entre anemia ferropriva e talassemia menor. Os Índices Green & King, Shine & Lal, Srivastava, Mentzer, Índice do RDW, Índice de Sirdah, Índice de Ricerca, Índice de Ehsani e o Novo Índice (NI) foram testados para os pacientes dos três grupos (AF, AF +Tal, Tal).

Entre os 155 pacientes portadores apenas de anemia ferropriva sem concomitância com  $\alpha$ -talassemia, o Novo Índice e o Índice do RDW foram as fórmulas que classificaram corretamente o maior número de pacientes, 154, correspondentes a 99,3%. Em segundo lugar, ficou o Índice de Green & King, que classificou de maneira correta 153 pacientes, o que representa 98,7% do grupo. Em seguida ao Índice de Green & King, o Índice de Sirdah, com um número de acertos de 148 correspondentes a 95,5% do grupo anemia ferropriva. Em quinto, sexto, sétimo e oitavo lugares ficaram os Índices de Srivastava, Ehsani, Mentzer e de Ricerca, que diagnosticaram corretamente 145, 138, 137 e 35 pacientes representando 93,5%, 89,0%, 88,4%, 22,6%, respectivamente. E, em último lugar, diagnosticando o menor número de pacientes corretamente, está o Índice de Shine & Lal. Tal índice teve somente 13 acertos representando um percentual de apenas 8,4% (**Tabela 6**).

Os 42 pacientes portadores concomitantemente de anemia ferropriva e  $\alpha$ -talassemia apresentaram os seguintes resultados na aplicação dos índices: o Índice de Shine e Lal apresentou o melhor desempenho considerando-se a indicação de talassemia como melhor resultado, diagnosticando corretamente 41 (97,6%) pacientes, seguido pelo Índice de Ricerca com 34 (80,9%) acertos. Em seguida, ficaram os Índices de Ehsani, Mentzer, Srivastava, Sirdah, Novo Índice, Green & King e, finalmente, o Índice do RDW que diagnosticaram como talassêmicos 6 (14,3%), 6 (14,3%), 5 (11,9%), 5 (11,9%), 4 (9,5%), 3 (7,1%) e 2 (4,8%) pacientes (**Tabela 6**).

No grupo dos pacientes portadores apenas de talassemia menor (Grupo 1), o melhor índice foi a fórmula de Ricerca que apresentou 100% de acertos. Em segundo

lugar, o Índice de Shine e Lal com 29 (96,7%) acertos. Na sequência, ficaram os Índices de Green & King, Novo Índice, Índice do RDW, Mentzer, Ehsani, Sirdah e, por último, o Índice de Srivastava que diagnosticaram de maneira correta 25, 23, 23, 22, 22, 20 e 16 pacientes, representando 83,3%, 76,7%, 76,7%, 73,3%, 73,3%, 66,7% e 53,3%, respectivamente (**Tabela 6**).

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

Índice	AF (n=155)	AF + Tal* (n=42)	Tal (n=30)
IGK	153 (98,7%)	3 (7,1%)	25 (83,3%)
NI	154 (99,3%)	4 (9,5%)	23 (76,7%)
IRDW	154 (99,3%)	2 (4,8%)	23 (76,7%)
ISR	145 (93,5%)	5 (11,9%)	16 (53,3%)
SL	13 (8,4%)	41 (97,6%)	29 (96,7%)
IM	137 (88,4%)	6 (14,3%)	22 (73,3%)
IE	138 (89,0%)	6 (14,3%)	22 (73,3%)
IS	148 (95,5%)	5 (11,9%)	20 (66,7%)
IR	35 (22,6%)	34 (80,9%)	30 (100,0%)

AF - anemia ferropriva, Tal - talassemia menor, IGK - Índice de Green & King, NI - Novo Índice, IRDW - Índice do RDW, ISR - Índice de Srivastava, SL - Índice Shine & Lal, IM - Índice de Mentzer, IE - Índice de Ehsani, IS - Índice de Sirdah, IR - Índice de Ricerca \* - Grupo de pacientes apresentando concomitantemente anemia ferropriva e talassemia menor; neste grupo considerou-se o melhor resultado para um índice a indicação de talassemia menor.

Para melhor comparar a qualidade intrínseca dos índices e avaliar o seu poder discriminatório na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor, os parâmetros sensibilidade, especificidade, eficiência e índice de Youden foram calculados.

Os maiores valores de sensibilidade no diagnóstico da talassemia menor foram observados para os Índices de Ricerca (100,0%) e Shine & Lal (96,7%). O terceiro maior valor de sensibilidade para talassemia menor foi de 83,3% e se refere ao Índice de Green & King. Logo depois do IGK, seguiram-se os Índices do RDW (76,7%) e Novo Índice (76,7%), Índice de Mentzer (73,3%) e Índice de Ehsani (73,3%) e Índice de Sirdah (66,7%). E, finalmente, o índice com menor sensibilidade diagnóstica para talassemia menor foi o Índice de Srivastava com um valor de apenas 53,3% para este parâmetro (**Tabela 7**).

Com relação à especificidade no diagnóstico da talassemia menor, o Novo Índice (NI) e o Índice do RDW apresentaram o maior valor para este parâmetro dentre as demais fórmulas discriminantes, sendo 99,3%. O segundo maior valor de especificidade foi atribuído ao Índice de Green & King, correspondendo a 98,7%. Em seguida, ficaram os Índice de Sirdah (95,5%), Srivastava (93,5%), Ehsani (89,0%), Mentzer (88,4%) e Ricerca (22,6%). A menor especificidade para diagnosticar a talassemia menor foi encontrada na aplicação da fórmula de Shine & Lal. Tal índice obteve uma especificidade de apenas 8,4% (**Tabela 7**).

O índice que apresentou a maior eficiência diagnóstica foi o Índice de Green & King, cujo valor para este parâmetro foi de 96,2% sendo que o Novo Índice e o Índice do RDW ocuparam o segundo lugar, obtendo 95,7% de eficiência. A menor eficiência foi observada para o Índice de Shine & Lal (22,7%) (**Tabela 7**).

Ao se analisar o parâmetro índice de Youden, foi observado que o maior valor encontrado pertenceu ao Índice de Green & King, valor este de 82,0. Logo em seguida ficaram o Novo Índice e o Índice do RDW para os quais foi verificado um índice de Youden de 76. A função discriminante de Shine & Lal mostrou o menor valor (5,1) para o índice de Youden (**Tabela 7**).

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

A combinação dos dois índices mostrou resultados satisfatórios se comparados os novos valores de sensibilidade, especificidade, eficiência e índice de Youden com os

valores encontrados para cada um dos dois índices aplicados isoladamente. Tal combinação permitiu, ainda, o encontro dos maiores valores para todos os parâmetros citados anteriormente com exceção da sensibilidade para o diagnóstico da talassemia menor dos Índices de Ricerca e Shine & Lal cujos valores atingiram 100% e 96,7%, respectivamente (**Tabela 7**).

**Tabela 7 - Sensibilidade, especificidade, eficiência e Índice de Youden de nove índices na discriminação entre anemia ferropriva (AF) e talassemia menor (Tal).**

Índice	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Eficiência (%)	Índice de Youden
<b>IGK</b>				
AF	98,7 (95,4; 99,6)	83,3 (66,4; 92,7)	96,2 (92,4; 98,2)	82,0
Tal	83,3 (66,4; 92,7)	98,7 (95,4; 99,6)		
<b>NI</b>				
AF	99,3 (96,4; 99,9)	76,7 (59,1; 88,2)	95,7 (91,7; 97,8)	76,0
Tal	76,7 (59,1; 88,2)	99,3 (96,4; 99,9)		
<b>IRDW</b>				
AF	99,3 (96,4; 99,9)	76,7 (59,1; 88,2)	95,7 (91,7; 97,8)	76,0
Tal	76,7 (59,1; 88,2)	99,3 (96,4; 99,9)		
<b>ISR</b>				
AF	93,5 (88,5; 96,5)	53,3 (36,1; 69,8)	87,0 (81,4; 91,1)	46,8
Tal	53,3 (36,1; 69,8)	93,5 (88,5; 96,5)		
<b>SL</b>				
AF	8,4 (5,0; 13,8)	96,7 (83,3; 99,4)	22,7 (17,3; 29,3)	5,1
Tal	96,7 (83,3; 99,4)	8,4 (5,0; 13,8)		
<b>IM</b>				
AF	88,4 (82,4; 92,5)	73,3 (55,5; 85,8)	85,9 (80,2; 90,2)	61,7
Tal	73,3 (55,5; 85,8)	88,4 (82,4; 92,5)		
<b>IE</b>				
AF	89,0 (83,1; 93,0)	73,3 (55,5; 85,8)	86,5 (80,8; 90,7)	62,3
Tal	73,3 (55,5; 85,8)	89,0 (83,1; 93,0)		
<b>IS</b>				
AF	95,5 (91,0; 97,8)	66,7 (48,8; 80,8)	90,8 (85,8; 94,2)	62,2
Tal	66,7 (48,8; 80,8)	95,5 (91,0; 97,8)		
<b>IR</b>				
AF	22,6 (16,7; 29,8)	100,0 (88,6; 100,0)	35,1 (28,6; 42,2)	22,6
Tal	100,0 (88,6; 100,0)	22,6 (16,7; 29,8)		
<b>IGK + NI</b>				
AF	100,0 (97,6; 100,0)	86,7 (70,3; 94,7)	97,8 (94,6; 99,2)	86,7
Tal	86,7 (70,3; 94,7)	100,0 (97,6; 100,0)		

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

Posteriormente, foram determinadas e comparadas as áreas sob a curva ROC de todos os nove índices testados. Foi verificado que o Índice de Green & King e o Índice do RDW apresentaram a maior área sob a curva ROC, um valor de 0,969, seguido pelo Novo Índice cujo valor deste parâmetro foi apenas ligeiramente inferior (0,950) provando que os referidos índices possuem a maior probabilidade de diagnosticar corretamente um paciente portador de talassemia menor ou anemia ferropriva. Embora exista pequena diferença numérica das áreas sob a curva ROC foi observado que os Índices de Green & King, do RDW, o Novo Índice e o Índice de Ricerca são estatisticamente iguais. O índice que apresentou menor área sob a curva foi o Índice de Shine & Lal com um valor de apenas 0,784 (**Tabela 8**).

Finalmente, para as comparações entre os testes diagnósticos (medidas qualitativas), utilizou-se a estatística *Kappa*. A fórmula com maior valor de *kappa* foi o Índice de Green & King (0,85), seguido do Novo Índice e Índice do RDW que apresentaram *kappa* de 0,83, o que mostra que estes três índices possuem excelente concordância com o método padrão-ouro. De forma semelhante ao verificado para a área sob a curva ROC, a função discriminante de Shine & Lal mostrou o menor valor (0,02) para o coeficiente *kappa*, mostrando ausência de concordância com os métodos padrão-ouro (**Tabela 8**).

**Tabela 8** - Valores de áreas sob a curva ROC e coeficiente *kappa* para as funções discriminantes testadas.

Índice	Área sob a curva ROC	<i>Kappa</i>
IGK	0,969	0,85 (0,71; 1,00)
NI	0,950	0,83 (0,68; 0,97)
IRDW	0,969	0,83 (0,68; 0,97)
ISR	0,887	0,49 (0,35; 0,64)
SL	0,784	0,02 (-0,02; -0,05)
IM	0,916	0,54 (0,40; 0,69)
IE	0,906	0,56 (0,41; 0,70)
IS	0,931	0,65 (0,50; 0,79)
IR	0,960	0,09 (0,03; 0,14)

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

## 6 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1 Considerações gerais

Os principais distúrbios que cursam com microcitose são a anemia ferropriva, ADC e talassemias. A anemia ferropriva é a mais prevalente no mundo enquanto a  $\beta$ -talassemia menor é comum nos países do Mediterrâneo (YERMIAHU *et al.*, 1999) e descendentes desta região. A  $\alpha$ -talassemia ocorre em alta frequência nas regiões tropicais e subtropicais do mundo incluindo o sudeste da Ásia e ilhas do Mediterrâneo (HIGGS & WEATHERALL, 2009; HARTEVELD & HIGGS, 2010).

Por razões várias, o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas reveste-se de grande importância clínica. Contudo, este diagnóstico diferencial das anemias microcíticas é, muitas vezes, complexo e sua investigação laboratorial apresenta custos significativos por serem necessários exames complementares ao hemograma. Atualmente, a comprovação diagnóstica da anemia ferropriva se faz pela avaliação do metabolismo do ferro, utilizando-se para isso dosagens laboratoriais que incluem ferro sérico, capacidade de ligação total do ferro sérico e, ainda, ferritina sérica. No caso da  $\beta$ -talassemia menor há necessidade da realização de eletroforese de hemoglobina e dosagens de HbA<sub>2</sub> e HbF para o seu diagnóstico. Os testes para diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia incluem a eletroforese de hemoglobina e pesquisa de HbH; entretanto, no caso do indivíduo apresentar apenas um ou dois genes deletados, a confirmação se faz somente por exames moleculares. Apesar de sua grande utilidade, estes exames padrão-ouro no diagnóstico destas anemias microcíticas e hipocrômicas e os exames moleculares, possuem, algumas vezes, uma metodologia demorada, são mais onerosos e, não raras vezes, inacessíveis a uma população menos favorecida. Somam-se aos fatores de ordem financeira, aqueles de ordem fisiopatológica. É bem conhecido que a talassemia menor e anemia ferropriva apresentam eritrócitos microcíticos e hipocrômicos, mas tais doenças têm patogênese, tratamento e prognóstico inteiramente diferentes. Enquanto a anemia ferropriva é corrigida com a suplementação do ferro, tal tratamento deveria ser totalmente evitado na talassemia dado que alguns pacientes talassêmicos apresentam maior absorção do ferro ou podem requerer transfusão sanguínea conforme necessidade do caso, levando gradativamente ao acúmulo do

ferro, principal complicação encontrada no paciente portador de talassemia. Entretanto, o diagnóstico da talassemia menor é, algumas vezes, negligenciado pelo clínico ao deparar com microcitose e níveis discretos de anemia; e, infelizmente o tratamento com suplementos férricos ainda é frequentemente prescrito numa vã tentativa de normalizar a microcitose (ELDIBANY *et al.*, 1999; OLIVIERI, 1999; YERMIAHU *et al.*, 1999; MELO *et al.*, 2002). Além disso, a ausência de um diagnóstico preciso de uma hemoglobinopatia diminui a eficiência dos programas de aconselhamento genético necessários para evitar possível ocorrência de homozigose nos descendentes.

## **6.2 Avaliação das mutações causadoras de $\alpha$ -talassemia**

Na população avaliada neste estudo, foi observada apenas a mutação deletional, 3.7, na frequência de 20,8%, sendo 19,3% em heterozigose e 1,5% em homozigose no grupo portador de anemia ferropriva e talassemia menor em concomitância. Além desta deleção, uma mutação não deletional, HphI, também foi observada em heterozigose na frequência de 0,5% no referido grupo. No segundo grupo estudado, portador unicamente de talassemia menor, a deleção 3.7 foi encontrada apenas em homozigose em percentual de 16,7% e a mutação HphI, na frequência de 3,3%.

Em relação à frequência das mutações causadoras de  $\alpha$ -talassemia, foram desenvolvidos alguns estudos na população brasileira. Sonati *et al.* (1991) estudaram, através de análise molecular, 47 indivíduos de etnia africana e demonstraram que 10 indivíduos (21,3%) foram heterozigotos e um (2,1%) foi homozigoto para a deleção 3.7. Adorno *et al.* (2005) realizaram um estudo sobre as hemoglobinopatias em recém nascidos de Salvador. Estes pesquisadores analisaram amostras de 514 recém nascidos para as mutações 3.7 e 4.2 da  $\alpha$ -talassemia e observaram que destes, 22,2% possuíam a deleção 3.7, sendo 19,7% heterozigotos e 2,5% homozigotos. Um estudo recente conduzido por Souza *et al.* (2009) avaliou a presença da deleção 3.7 em uma população do Pará e encontraram, entre os 103 pacientes anêmicos, um percentual de 19,4% de indivíduos heterozigotos e 1,0% de homozigotos para a referida mutação, o que somados totalizam 20,4% dos referidos pacientes. O resultado destes estudos

condiz com a frequência observada no presente trabalho: 20,3% dos 227 pacientes são portadores da deleção 3.7.

Já Bezerra (2010), investigaram a presença da deleção 3.7 em 319 pacientes atendidos no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro Dalton Barbosa Cunha, em Natal e encontraram frequências maiores em relação ao nosso estudo. Dos 319 pacientes, 105 (32,9%) apresentaram  $\alpha$ -talassemia, sendo 93 (29,1%) heterozigotos ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) e 12 (3,8%) homozigotos ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ).

Borges *et al.* (2001) realizaram um estudo em Campinas, São Paulo, no qual 339 pacientes adultos com níveis de hemoglobina normais e VCM e HCM diminuídos, ou seja, portadores de microcitose e hipocromia sem anemia. As mutações delecionais e não delecionais mais comuns associadas à  $\alpha$ -talassemia ( $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $--^{MED}$ ,  $-(\alpha)^{20.5}$ ,  $\alpha^{HphI}$ ,  $\alpha^{Ncol}$ ,  $\alpha\alpha^{Ncol}$  e  $\alpha^{TSAUDI}$ ) foram pesquisadas. Um total de 169 indivíduos (49,9%) apresentou  $\alpha$ -talassemia: 145 (42,8%) foram heterozigotos para a deleção 3.7 ( $-\alpha^{3.7}/\alpha\alpha$ ) e 18 foram homozigotos ( $-\alpha^{3.7}/-\alpha^{3.7}$ ), 5 (1,5%) foram heterozigotos para a mutação não delecional HphI ( $\alpha^{HphI}/\alpha\alpha$ ) e 1 (0,3%) apresentou a deleção MED ( $--^{MED}/\alpha\alpha$ ).

Filho *et al.* (2005), realizaram, no Rio de Janeiro, um estudo descritivo, visando, dentre outros objetivos, a identificação de hemoglobinas variantes e de talassemia  $\alpha$  e  $\beta$ . Dos 2190 pacientes incluídos no estudo, 16 foram portadores da deleção 3.7 (0,7%), quatro deles (0,2%) em concomitância com o traço falciforme.

Wagner *et al.* (2005) estudaram, no Rio Grande do Sul, 58 casos de pacientes comprovadamente portadores de anemia não ferropênica e 235 controles obtidos de pessoas sem anemia. A análise dos dados realizada no grupo de pacientes com anemia não ferropênica demonstrou que 25,9% eram portadores de  $\alpha$ -talassemia heterozigota e no grupo dos controles foram identificados 11,5% de  $\alpha$ -talassemia. Contudo, a análise qualitativa das frações hemoglobínicas foi realizada por eletroforese em fita de acetato de celulose em pH alcalino e a quantificação das HbA, A<sub>2</sub>, F, S e C, além da identificação, quando possível, de HbH, foi realizada por sistema automatizado de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC). Foi ainda realizada, para o diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia, a pesquisa citológica HbH após incubação com azul de cresil brilhante, não sendo utilizada, então, a biologia molecular.

Em estudo realizado por Viana-Baracioli *et al.* (2001) em São Paulo, foi realizada a pesquisa de hemoglobinopatias em 696 gestantes sendo observado que 47 delas (6,75%) eram portadoras de  $\alpha$ -talassemia. Porém, este diagnóstico foi feito sem a utilização de métodos moleculares, baseando-se apenas em testes convencionais tais como eritograma, análise da morfologia eritrocitária, eletroforese em acetato de celulose em pH alcalino e análise citológica após coloração vital com azul de cresil brilhante.

Seixas *et al.* (2008) investigaram a incidência de hemoglobinopatias na população da cidade de Umuarama, no Paraná, que historicamente recebeu grande contingente de imigrantes de vários países do mundo. Um total de 545 amostras de sangue foi coletado de indivíduos habitantes de Umuarama. Observou-se que a  $\beta$ -talassemia menor foi a hemoglobinopatia mais frequente na população desta cidade correspondendo a 2,73% das amostras analisadas, sendo que o traço  $\alpha$ -talassêmico estava presente em 1,37% dos indivíduos avaliados. Entretanto, também neste estudo foram utilizados apenas métodos convencionais de diagnóstico para a detecção da  $\alpha$ -talassemia tais como pesquisa de HbH após coloração com azul de cresil brilhante e eletroforese de hemoglobina em pH alcalino.

Recentemente, Wagner *et al.* (2010) pesquisaram as deleções  $-\alpha^{3.7}$ ,  $-\alpha^{4.2}$ ,  $-\alpha^{20.5}$ ,  $--_{MED}$ ,  $--_{SEA}$  em 493 indivíduos no Rio Grande do Sul. Destes 493 indivíduos, 101 possuíam anemia microcítica com suspeita clínica de  $\alpha$ -talassemia, dosagem de HbA<sub>2</sub> inferior a 3,5% e HbF inferior a 1%. Neste grupo, apenas foi encontrada a deleção 3.7, em 23 (22,8%) pacientes na forma heterozigota e em nove (8,9%) pacientes na forma homozigota.

Outro estudo, conduzido por Couto *et al.* (2003) na Bahia, analisaram a presença da deleção 3.7 em um grupo de 53 mulheres grávidas heterozigotas para a hemoglobina C e em 53 mulheres grávidas com perfil eletroforético normal compatível com HbAA. No grupo de mulheres heterozigotas para HbAC, 11 (21%) foram heterozigotas e uma (2%) foi homozigota para a deleção 3.7. No grupo das mulheres com perfil eletroforético normal, 12 (23%) foram heterozigotas para a mutação 3.7.

Em recente estudo realizado em Minas Gerais por Belisário *et al.* (2010) foi observado que, dentre 221 crianças com anemia falciforme, 66 (29,90%) eram portadoras da deleção 3.7.

Uma possível explicação para a diferente frequência da  $\alpha$ -talassemia nos vários estudos já realizados está relacionada à origem étnica da população estudada e, também, às variadas metodologias empregadas para o diagnóstico laboratorial dessa hemoglobinopatia.

Finalmente, os dados encontrados no presente estudo sobre a frequência da principal deleção causadora de  $\alpha$ -talassemia ( $-\alpha^{3.7}$ ) e, ainda de estudos anteriores, confirmam que as hemoglobinopatias são, realmente, um problema de saúde pública no Brasil e indicam a importância de investigar a presença da  $\alpha$ -talassemia em indivíduos cujo hemograma apresenta microcitose, a fim de evitar uma suplementação férrica desnecessária e potencialmente danosa. Além disso, estes resultados enfatizam, também, a importância dos programas de triagem neonatal e aconselhamento genético.

Cabe salientar que, em nosso estudo, dentre todos os pacientes do grupo recrutado no Hospital das Clínicas portadores de  $\alpha$ -talassemia, confirmada por métodos moleculares, todos possuíam pesquisa de HbH negativa e perfil eletroforético compatível com HbAA e um deles com HbAC, revelando, assim, a baixa sensibilidade destes métodos convencionais para o diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia em suas formas menores. Isto confirma a necessidade de métodos moleculares como testes confirmatórios desta hemoglobinopatia ou a aplicação dos índices como ferramenta de triagem.

### **6.3 Caracterização dos pacientes**

Em relação à caracterização dos dois grupos de pacientes, um achado que chama a atenção é a prevalência significativamente maior da anemia ferropriva entre mulheres (91,6%) em relação a homens (8,4%) possivelmente por serem as mulheres, dentre indivíduos adultos, o grupo de maior risco, apresentando grande perda de ferro nos períodos menstruais, gravidez e lactação. A maior frequência de anemia ferropriva

em mulheres devido à perda menstrual e gravidez já foi relatada por Higgins & Rockey (2003). No grupo de pacientes portadores de talassemia menor também houve maior prevalência de mulheres (66,7%). Contudo, por não ser a talassemia uma doença genética ligada ao sexo, acredita-se que a diferença na prevalência ocorreu meramente pelo fato de que, usualmente, são as mulheres que mais buscam o serviço de saúde para realização de *check-up* ou acompanhamento de doenças.

O grupo talassemia menor apresentou pequeno número de pacientes, apesar do longo tempo buscando novos casos do distúrbio. Acreditamos que a frequência de casos de talassemia menor seja bem maior que o número de pessoas que procuram um serviço especializado, uma vez que a maioria dos casos não possui sintomatologia que justifique a busca por atendimento clínico. Tal fato pode ser comprovado observando-se o significativo número de pacientes portadores, concomitantemente, de anemia ferropriva e talassemia menor, 42 (21,3%) dos 197 pacientes do grupo anemia ferropriva total.

#### **6.4 Parâmetros do hemograma**

Com o intuito de diferenciar as várias anemias microcíticas, vem sendo proposta a utilização de vários parâmetros obtidos da análise de eritrócitos realizada nos modernos contadores eletrônicos e índices derivados de tais parâmetros. Comparando-se os pacientes dos grupos AF e Tal, foi possível verificar diferença significativa em todos os parâmetros hematológicos analisados: número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM, RDW e plaquetas. O maior número de eritrócitos foi observado na talassemia menor, o que se encontra relacionado à fisiopatologia da talassemia menor na qual a precipitação de cadeias globinicas nos precursores eritróides e eritrócitos circulantes resulta em uma discreta eritropoese ineficaz, aumento da eritropoetina e, finalmente, uma leve a moderada expansão da eritropoese pela medula óssea na tentativa de compensar a anemia. Este mecanismo se manifesta por um aumento no número de hemácias do sangue (HILLIARD & BERKOW, 1996; HANDIN *et al.*, 2003; SCHRIER & ANGELUCCI, 2005). A hiperplasia eritróide da medula óssea consegue elevar a contagem de eritrócitos muito acima da usual mas, na

maioria das vezes, não consegue atingir um valor de hemoglobina normal; os micrócitos, mesmo em número excessivo, são insuficientes. É lícito fazer a suposição de que, se não houvesse certa eritropoese ineficaz e leve diminuição da sobrevivência eritróide pelo efeito deletério da precipitação do excesso de cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , a eritrocitose seria ainda maior, e a anemia, totalmente compensada (FAILACE, 2003).

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

De forma similar ao número de hemácias, os maiores valores de hemoglobina foram encontrados no grupo talassemia menor, o que pode ser explicado, de forma semelhante ao discutido para o número de hemácias, pelo mecanismo associado à talassemia menor. Realmente, as talassemias menores produzem mínimos decréscimos na concentração de hemoglobina (CLARKE & HIGGINS, 2000). Yermiahu *et al.* (1999), de maneira semelhante ao observado neste trabalho, verificaram que os pacientes com  $\beta$ -talassemia menor possuem uma leve anemia e contagens relativamente altas de eritrócitos, enquanto os pacientes com anemia ferropriva apresentavam resultados mais baixos para a concentração de hemoglobina e número

de hemácias se comparados aos pacientes  $\beta$ -talassêmicos menores. No estudo destes pesquisadores, os referidos parâmetros foram significativamente mais altos em pacientes com traço  $\beta$ -talassêmico comparados aos pacientes com anemia ferropriva. Em dissertação recente (MATOS, 2007), foi também observado que os pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia menor apresentavam maiores valores de hemácias e hemoglobina. Também Shen *et al.* (2010) observaram maiores valores de hemácias e hemoglobina nos pacientes  $\beta$ -talassêmicos comparados aos pacientes do grupo anemia ferropriva.

O parâmetro VCM se mostra nitidamente maior na anemia ferropriva, refletindo uma menor microcitose, ou seja, o comprometimento na síntese de hemoglobina é menor comparado à talassemia menor. Analisando de maneira conjunta os parâmetros número de hemácias, hemoglobina e VCM, foi observado que o paciente talassêmico apresenta os maiores valores para número de hemácias e hemoglobina e os menores para VCM. Tal observação está de acordo com Lafferty *et al.* (1996) que relatam que para um dado valor de VCM, o nível de hemoglobina e o número de eritrócitos tendem a ser mais altos na talassemia menor em comparação à anemia ferropriva; ou seja, para um mesmo grau de anemia, os eritrócitos na talassemia menor são mais microcíticos do que na anemia ferropriva. Consequentemente, o VCM tende a ser menor e a contagem de hemácias maior em casos de talassemia menor (GREEN & KING, 1989; MELO *et al.*, 2002). Lafferty *et al.* (1996) verificaram a importância do VCM como o índice mais promissor para discriminar entre as microcitoses talassêmicas das não talassêmicas. Também nos estudos de Yermiahu *et al.* (1999), Sirdah *et al.* (2008), Shen *et al.* (2010), Janel *et al.* (2011) foi observado que o VCM se mostrou significativamente menor em pacientes com traço  $\beta$ -talassêmico comparados aos pacientes com anemia ferropriva.

Outro parâmetro sugerido para a distinção entre as condições que cursam com microcitose é o RDW, descrito primeiramente por Bessman & Feinstein (1979) e que, atualmente, consta das análises dos contadores automáticos modernos. Tal índice reflete a heterogeneidade de distribuição do tamanho dos eritrócitos medindo o coeficiente de variação em torno do VCM (TRENT, 2006). Bessman & Feinstein (1979), observaram que os eritrócitos de pacientes com talassemia menor são mais

homogêneos quando comparados aos dos pacientes com anemia ferropriva. Conseqüentemente, o RDW tende a ser maior na anemia ferropriva do que nas talassemias menores (TRENT, 2006). Nas talassemias do tipo menor, quase todos os eritrócitos são microcíticos devido a uma síntese deficiente de cadeias globínicas conseqüente a mutações expressas igualmente em todos os precursores de hemácias, tornando os valores de RDW relativamente constantes (ASLAN *et al.*, 2002). O mesmo não ocorre na anemia ferropriva onde a anisocitose verificada é devido à coexistência, no sangue periférico, de hemácias produzidas na medula óssea durante estágios progressivos de deficiência do ferro, dando lugar a uma população variada de eritrócitos incluindo normocíticos e aqueles progressivamente microcíticos (GREEN & KING, 1989). O aporte intermitente de ferro à medula óssea, reflexo da redução das reservas de ferro do organismo e da ingestão desigual de ferro, em dias sucessivos, vem corroborar também para o aumento da anisocitose.

Contudo, existem controvérsias sobre a eficácia do RDW como parâmetro auxiliar na distinção das anemias. Yermiahu *et al.* (1999) e Aslan *et al.* (2002) verificaram a existência de diferença significativa para o RDW entre os pacientes com anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor. O mesmo não foi encontrado nos estudos de Flynn *et al.* (1986), Tillyer & Tillyer (1994), Lafferty *et al.* (1996), Alfadhli *et al.* (2006) e Matos (2007) que provaram ser o RDW um índice com pequeno poder discriminatório e contribuição limitada na diferenciação dos estados microcíticos. Eldibany *et al.* (1999) e Ferrara *et al.* (2010) encontraram valores aumentados de RDW em ambas, talassemia menor e anemia ferropriva. No estudo de Demir *et al.* (2002) foi observada uma pequena acurácia diagnóstica para o RDW, uma vez que este parâmetro classificou corretamente apenas 59% dos pacientes e apresentou um índice de Youden de 30, superior apenas ao Índice de Shine & Lal. No Brasil, Lima *et al.* (1996) avaliando a utilidade clínica do RDW, verificaram que 90% dos pacientes com anemia ferropriva e 77% dos pacientes com  $\beta$ -talassemia menor foram corretamente identificados usando valores de RDW superiores ou inferiores a 21%, respectivamente. Sob a ótica de tais resultados foi concluído que o RDW poderia ser um método específico e sensível para identificar a anemia ferropriva entre pacientes apresentando hemograma com microcitose; contudo, este parâmetro não seria um bom índice para a identificação da  $\beta$ -

talassemia menor. Desta forma, uma correta distinção entre estes distúrbios não poderia ser realizada baseando-se apenas no RDW.

Com os dados de RDW dos pacientes recrutados neste estudo, foi verificada diferença significativa entre os dois grupos de anemias microcíticas, indicando uma possível utilidade deste parâmetro como auxiliar na diferenciação destas anemias.

Em relação aos índices plaquetários, existem poucos relatos sobre a sua eficiência na diferenciação entre as anemias microcíticas e hipocrômicas. Neste estudo foi observado um maior número de plaquetas no grupo anemia ferropriva, o que poderia auxiliar na discriminação entre esta anemia e a talassemia menor. A trombocitose é observada em muitos distúrbios incluindo infecção, inflamação, malignidade, sangramento agudo e anemia ferropriva. A anemia ferropriva é, particularmente, uma causa de trombocitose reativa de grau leve a moderado (DAN, 2005). Yadav *et al.* (2010) observaram que em sua amostra de pacientes com trombocitose, a anemia ferropriva foi, entre os distúrbios hematológicos, a causa mais comum da trombocitose, sendo responsável por 41,3% dos casos (dentre estes, 12,6% possuíam unicamente anemia ferropriva e 28,7% possuíam concomitância de anemia ferropriva e várias infecções). Kuku *et al.* (2009) observaram nos pacientes estudados portadores de anemia ferropriva uma trombocitose leve a moderada. Bilic e Bilic (2003) sugeriram que a homologia entre a sequência de aminoácidos da eritropoetina e da trombopoetina poderia explicar a trombocitose em crianças com anemia ferropriva. Contudo, Racke (2003) relatou ocorrer evidência contrária a esta hipótese, visto que alguns pacientes portadores de anemia ferropriva e níveis aumentados de eritropoetina apresentavam contagens de plaquetas normais. Além disso, outros distúrbios associados ao aumento da eritropoetina, tais como anemias hemolíticas, não cursam com trombocitose.

Em relação à diferenciação entre talassemia menor e anemia ferropriva baseando em parâmetros plaquetários, um estudo foi realizado por Timuragaoglu *et al.* (2004), no qual estes pesquisadores verificaram diferença significativa entre todos os parâmetros plaquetários (número de plaquetas, VPM e PDW) quando o grupo anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor foram comparados; observação esta que os levaram à conclusão de que tais parâmetros poderiam ser usados na distinção das referidas anemias.

## 6.5 Potencial aplicação de índices na discriminação de anemias microcíticas e hipocrômicas

Muitos estudos anteriores a este já foram realizados para verificação e comparação da eficácia no uso de fórmulas discriminantes e apresentam conclusões variadas (GREEN & KING, 1989; LAFFERTY *et al.*, 1996; DEMIR *et al.*, 2002; ALFADHLI *et al.*, 2006, SHEN *et al.*, 2010). Segundo Janel *et al.* (2011) estas variações observadas nos estudos sobre comparação de índices poderiam ser explicadas pela relação existente entre a mutação causadora de talassemia e o fenótipo apresentado pelo indivíduo portador da mutação, refletido, principalmente pela alteração no VCM. Os resultados obtidos neste estudo revelam que os índices que melhor diferenciam talassemia menor e anemia ferropriva são o Índice de Green & King, o Novo Índice (NI) e o Índice do RDW, levando-se em consideração os parâmetros eficiência, índice de Youden, área sob curva ROC e coeficiente *kappa*. A amostra utilizada neste estudo para a validação do Novo Índice e para verificação da acurácia das demais fórmulas apresentou um poder de discriminação de 3%, ou seja, a amostra de 185 pacientes tem 80% de poder de captar diferenças de área sob a curva ROC de 3% ou mais. Esta análise foi realizada por meio de reamostragem *Bootstrap* (Para maiores detalhes vide Anexo A).

O Índice de Green & King mostrou 83,3 e 98,7% para sensibilidade e especificidade no diagnóstico da talassemia menor, respectivamente. O índice de Youden obtido para o IGK apresentou um valor de 82,0, eficiência de 96,2% e área sob a curva ROC de 0,969. Todos estes valores foram superiores aos encontrados em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007). O estudo de Demir *et al.* (2002) que também testou vários índices dentre estes, o de Green & King, encontrou para esta função discriminante, um valor de 67 para o índice de Youden. No resultado global, a fórmula desenvolvida por Green & King foi a terceira melhor para a discriminação entre  $\beta$ -talassemia menor e anemia ferropriva. Já o resultado encontrado por Liu *et al.* (1997) foi de que a fórmula de Green & King se mostrou a melhor função discriminante dentre aquelas testadas.

No trabalho original de Green & King (1989) a fórmula estabelecida por estes autores identificou corretamente 100% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 100% dos pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia menor. Um resultado semelhante ao de Green & King (1989) foi encontrado por Lima *et al.* (1996) no qual o Índice de Green & King corretamente identificou 97% dos pacientes com anemia ferropriva e o mesmo percentual de  $\beta$ -talassêmicos menores, porém usando um valor de *cut-off* de 80. Estes autores concluíram, então, que a função discriminante de Green & King poderia ser útil no *screening* inicial visando a diferenciação entre anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor. Em outro estudo também realizado no Brasil por Melo *et al.* (2002) foi observado um valor de eficiência de 82,6% para a fórmula de Green & King. No trabalho realizado por Alfadhli *et al.* (2006), foi observado, ao contrário dos outros estudos já citados, que a fórmula de Green & King esteve entre as três fórmulas com menor desempenho na separação de tais doenças, mostrando um índice de Youden de 47,6. Ntaios *et al.* (2007) encontraram os melhores valores de eficiência (80,12%) e índice de Youden (70,86) para o Índice de Green & King. Contudo, a conclusão dos referidos pesquisadores é de que nenhuma das fórmulas testadas poderia ser utilizada para *screening* para  $\beta$ -talassemia, pois, resultariam em elevado número de falso negativos.

Okan *et al.* (2009) concluíram em seu estudo que os índices de Shine & Lal e o de Green & King foram as melhores fórmulas na diferenciação entre  $\beta$ -talassemia menor e anemia ferropriva. Em seu grupo de pacientes portadores de leve a moderada anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor, estes pesquisadores encontraram valores de sensibilidade (83%), especificidade (96%) e índice de Youden (79) bastante parecidos aos deste estudo. Outros dois estudos recentes compararam várias fórmulas discriminantes: o de Ferrara *et al.* (2010) no qual o índice de Green & King apresentou o maior valor de eficiência (80,2%) usando um *cut-off* de 73; e o de Shen *et al.* (2010) cujo maior índice de Youden (85,4) e área sob a curva ROC (0,947) foram observados para a fórmula de Green & King utilizando, porém, um *cut-off* revisado de 75,29. Utilizando-se um *cut-off* de 65, determinado previamente por Green & King, Shen *et al.* (2010) observaram valores de sensibilidade (85%), especificidade (94,8%) e índice de Youden (79,8) também semelhantes aos verificados no presente trabalho.

No estudo realizado por Matos (2007) o Índice de Green & King mostrou um valor de eficiência (91,5%) e um índice de Youden (73,5) levemente menores. No estudo mais recente sobre aplicação dos índices realizado por Janel *et al.* (2011) foi verificado um índice de Youden de 82,76 e área sob curva ROC de 0,958 para o Índice de Green & King, valores estes bastante semelhantes ao encontrado no presente estudo.

O Novo Índice apresentou excelente acurácia diagnóstica apresentando parâmetros como eficiência, sensibilidade, índice de Youden, área sob a curva ROC e coeficiente *Kappa* bastante elevados e somente discretamente menores comparados aos do Índice de Green & King. Além disso, os valores do coeficiente *kappa*, de eficiência, índice de Youden, sensibilidade e especificidade foram iguais aos encontrados para o Índice do RDW, fórmula também já consagrada na literatura. Em relação ao Novo Índice, os únicos dados de acurácia diagnóstica são aqueles obtidos em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007) quando a fórmula foi desenvolvida sendo: sensibilidade de 87,0% e especificidade de 94,0%, eficiência semelhante ao resultado atual (92,4%), índice de Youden ligeiramente maior (81,0) e área sob a curva ROC de 0,895.

Um resultado importante obtido para o Novo Índice foi um valor de sensibilidade para a detecção da anemia ferropriva bastante elevado (99,3%), superior a todos os demais índices, juntamente com o IRDW. Sendo a sensibilidade um parâmetro que indica a proporção de indivíduos com a doença que são corretamente identificados pelo teste, um valor elevado de sensibilidade na detecção da anemia ferropriva indica que o Novo Índice é uma boa ferramenta para identificar esta doença. Pode-se admitir que um índice discriminativo que diagnostica corretamente a anemia ferropriva seria mais valioso clínica e comparativamente àqueles que diagnosticam corretamente a talassemia menor. Isto se deve ao fato de que a suplementação férrica por um mês para um paciente erroneamente classificado como portador de anemia ferropriva e que é portador de talassemia menor traz menores prejuízos que a falta desta suplementação para um paciente que possui anemia ferropriva e que foi erroneamente classificado como portador de talassemia menor. O ferro, juntamente com a eritropoetina, é necessário para a formação da hemoglobina (ZAGO *et al.*, 2005). Além

disso, o ferro é um componente de proteínas necessárias em processos celulares cruciais tais como o transporte e utilização do oxigênio, produção de trifosfato de adenosina (ATP), síntese de DNA, metabolismo de catecolaminas, transporte de elétrons mitocondrial e outros processos fisiológicos (BEARD *et al.*, 1996; NOBILI *et al.*, 2001; COHEN *et al.*, 2004). Dessa forma, o sistema imune, as funções neurológicas e o desempenho no trabalho são todos afetados com a carência do ferro (NOBILI *et al.*, 2001).

O Novo Índice (NI) representa uma inovação na discriminação entre anemia ferropriva e talassemia menor, com potencialidade de ampla aplicação, considerando apresentar a vantagem de ser dependente apenas do número de hemácias e do CHCM, parâmetros facilmente obtidos nos mais simples contadores de células, portanto, não demandando o uso de contadores mais sofisticados.

O Índice do RDW teve, também, excelente desempenho na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor, apresentando uma eficiência de 95,7%, área sob a curva ROC de 0,969 e índice de Youden de 76,0. Todos estes valores foram superiores aos encontrados em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007). Este índice obteve ainda 76,7% e 99,3% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, no diagnóstico da talassemia menor.

O estudo conduzido por Jayabose *et al.* (1999) onde o Índice do RDW foi criado, envolveu 102 pacientes, 46 destes portadores de anemia ferropriva e 56 de talassemia menor e mostrou sensibilidade e especificidade de 92,8% para tal fórmula no diagnóstico da talassemia menor. Já no estudo de Demir *et al.* (2002) foi encontrado um resultado de 100% de sensibilidade, 80% de especificidade e índice de Youden de 80, sendo este índice considerado por tais pesquisadores, a segunda melhor fórmula testada. Alfadhli *et al.* (2006) encontraram ao investigar esta mesma fórmula, valores de 65,9% para sensibilidade, 83,9% de especificidade e índice de Youden de 49,8 e, no geral, o Índice do RDW ocupou o sexto lugar como melhor função discriminante. No estudo de Ntaios *et al.* (2007) foram testadas seis fórmulas e o Índice do RDW ocupou o quinto lugar com um índice de Youden de 56,3. Okan *et al.* (2009) encontraram os seguintes valores para o Índice do RDW: sensibilidade (83%), especificidade (78%) e índice de Youden de 61. Em três estudos recentes, de Shen *et al.* (2010), Ferrara *et al.*

(2010) e Janel *et al.* (2011) foram verificados os seguintes valores de índice de Youden para o IRDW: 80,9, 56,2 e 82,76, respectivamente.

Em relação à eficiência, o Índice de Sirdah foi a quarta melhor fórmula discriminativa apresentando um índice de Youden de 62,2, eficiência de 90,8 e área sob curva ROC de 0,931. No estudo de Sirdah *et al.* (2008), no qual foi desenvolvido o índice dos referidos pesquisadores, foi verificado um valor de 0,914 de área sob curva ROC. Poucos estudos testaram a fórmula de Sirdah *et al.*, visto ter sido criada há relativamente pouco tempo. Dentre estes, Shen *et al.* (2010) e Janel *et al.* (2011) encontraram valores semelhantes ao presente estudo para a área sob a curva ROC, 0,921 e 0,947, respectivamente; contudo, índices de Youden ligeiramente superiores de 78,8 e 77,63, respectivamente.

O Índice de Srivastava, também aplicado aos pacientes envolvidos neste estudo, apresentou o quinto maior valor para o parâmetro eficiência, 87,0%; índice de Youden, 46,8 e área sob a curva ROC, 0,887. Os resultados observados nos estudos que testaram o Índice de Srivastava foram bastante variados. Green & King (1989) observaram que 79% dos pacientes com anemia ferropriva e 91% dos pacientes  $\beta$ -talassêmicos menores foram corretamente diagnosticados pelo Índice de Srivastava. Demir *et al.* (2002) encontraram, para o discriminante de Srivastava, baixos valores para sensibilidade e especificidade para  $\beta$ -talassemia menor, a saber 60% e 77%, respectivamente. Tal índice apresentou também um baixo índice de Youden (37), valor próximo ao encontrado no presente estudo; sendo que tais resultados fizeram com que este índice mostrasse um dos piores desempenhos entre os oito discriminantes testados por estes pesquisadores. Também Shen *et al.* (2010) encontraram um valor baixo para o índice de Youden (36,0) na aplicação da fórmula de Srivastava. Alfadhli *et al.* (2006) encontraram um valor de sensibilidade de 85% e 69,6% de especificidade para  $\beta$ -talassemia menor e, um índice de Youden de 54,9. Os resultados destes parâmetros levaram a classificar o Índice de Srivastava por tais pesquisadores como quarto melhor discriminante entre anemia ferropriva e  $\beta$ -talassemia menor, de maneira contrária ao encontrado por Demir *et al.* (2002). Beyan *et al.* (2007) e Okan *et al.* (2009) encontraram índices de Youden, 50,2 e 53, respectivamente, bem próximos daquele encontrado por Alfadhli *et al.* (2006); contudo, foi o quarto e terceiro menores valores

deste parâmetro dentre as nove fórmulas testadas nos referidos estudos. Janel *et al.* (2011) observaram o terceiro menor valor do índice de Youden para a fórmula de Srivastava; entretanto, o valor deste parâmetro (82,17) foi bastante superior ao encontrado por Beyan *et al.* (2007) e Okan *et al.* (2009). Sirdah *et al.* (2008) obtiveram um valor de área sob curva ROC (0,882) muito semelhante ao observado no presente estudo. Em dissertação de Mestrado recente (MATOS, 2007), foram testadas seis fórmulas discriminantes e o Índice de Srivastava apresentou o segundo menor valor para o parâmetro eficiência, 69,8%; índice de Youden de 42,6 e área sob a curva ROC, 0,775.

Outra fórmula discriminante, o Índice de Ehsani, apresentou o sexto maior valor de eficiência (86,5%) na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor. Em relação ao índice de Youden e área sob curva ROC foram encontrados valores de 62,3 e 0,906, respectivamente. Poucos foram os trabalhos da literatura que testaram a fórmula de Ehsani, entre estes o de Sirdah *et al.* (2008) que encontraram um valor de área sob curva ROC (0,899) semelhante ao encontrado neste estudo. Shen *et al.* (2010) e Janel *et al.* (2011) verificaram, para o Índice de Ehsani, valores de índice de Youden, 51,3 e 75,13, respectivamente, bastante diferentes do encontrado no presente trabalho.

Outro índice testado, denominado Índice de Mentzer, foi considerado o sétimo melhor discriminante entre  $\beta$ -talassemia menor e anemia ferropriva apresentando eficiência de 85,9%, sensibilidade de 73,3%, especificidade de 88,4%, área sob a curva de 0,916 e índice de Youden de 61,7. No trabalho realizado por England & Fraser (1979) onde foram testadas somente três fórmulas discriminantes, os resultados indicaram que o Índice de Mentzer obteve o segundo melhor resultado na diferenciação dos casos de microcitose, identificando corretamente 87,4% dos pacientes. Green & King (1989) encontraram na amostra empregada para testar o índice de sua autoria, que o Índice de Mentzer corretamente diagnosticou 82% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 94% dos  $\beta$ -talassêmicos menores. Para Lafferty *et al.* (1996), o Índice de Mentzer juntamente com outras duas funções foram os melhores discriminantes, mostrando as maiores áreas sob a curva ROC. Outro trabalho testando a fórmula de Mentzer foi o Jayabose *et al.* (1999) que encontraram um valor de

sensibilidade 87,5% e especificidade 81,6% para o diagnóstico da talassemia menor. Na amostra usada para o trabalho de Eldibany *et al.* (1999), o Índice de Mentzer apresentou uma sensibilidade de 70,6%, a terceira maior sensibilidade entre os cinco discriminantes testados para a diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor. Já os valores encontrados para sensibilidade e especificidade da fórmula de Mentzer no trabalho de Demir *et al.* (2002) foram 86% e 62% respectivamente para o diagnóstico da  $\beta$ -talassemia menor; e, ainda, um índice de Youden de 48. Outro estudo conduzido por Alfadhli *et al.* (2006), colocou o Índice de Mentzer como o terceiro melhor discriminante baseado no índice de Youden, valor este de 60,1, semelhante ao encontrado no presente estudo. Estes autores encontraram para a referida fórmula sensibilidade de 74,4% e especificidade de 85,7% no diagnóstico da  $\beta$ -talassemia menor, valores estes também parecidos aos encontrados neste estudo. Beyan *et al.* (2007), Ntaios *et al.* (2007), Shen *et al.* (2010) e Ferrara *et al.* (2010) verificaram um índice de Youden de 64,6, 58,08, 55,1 e 56,9, respectivamente, valores estes bem próximos ao do presente estudo. Okan *et al.* (2009) encontraram para o Índice de Mentzer valores de 82% para sensibilidade, 78% para especificidade e o sexto maior valor para o índice de Youden (60) dentre as nove fórmulas testadas por estes pesquisadores. O resultado de área sob curva ROC (0,921) encontrado por Janel *et al.* (2011) para o IM foi bastante semelhante ao observado neste estudo. Em dissertação de Mestrado (MATOS, 2007) foram observados valores de índice de Youden (56,3) e de eficiência (83,0%) semelhantes aos encontrados no atual estudo.

Em oitavo lugar em valor de eficiência (35,1%) ficou o Índice de Ricerca cujos valores de índice de Youden e área sob a curva ROC foram 22,6 e 0,960. Poucos estudos testaram a eficiência da fórmula de Ricerca. Beyan *et al.* (2007) e Okan *et al.* (2009) encontraram valores de índice de Youden baixos para a fórmula de Ricerca sendo -0,2 e 12, respectivamente, revelando a pequena acurácia desta fórmula na diferenciação entre anemia ferropriva e talassemia menor. Nos estudos de Alfadhli *et al.* (2006) e Shen *et al.* (2010) foram observados valores de índice de Youden semelhantes, a saber: 51,6 e 54,1, respectivamente. Dentre as fórmulas testadas por Janel *et al.* (2011), o Índice de Ricerca apresentou o quarto menor valor do índice de Youden (66,63).

Finalmente, o Índice de Shine & Lal se mostrou o discriminante com pior desempenho na distinção entre anemia ferropriva e talassemia menor. O índice em questão apresentou um valor de eficiência e índice de Youden de apenas 22,7% e 5,1, respectivamente; e, a menor área sob a curva ROC (0,784), revelando a baixa acurácia da fórmula. Os resultados encontrados estão de acordo com os achados de Demir *et al.* (2002), Alfadhli *et al.* (2006), Beyan *et al.* (2007), Matos (2007) e Shen *et al.* (2010) que encontraram valores do índice de Youden extremamente baixos, de zero, 0,5, 11,1, 4,8 e -0,8, respectivamente. Como já citado anteriormente, um índice de Youden com valor próximo a zero sugere que o método utilizado não é melhor que qualquer técnica usada ao acaso. Os pesquisadores Green & King (1989) já haviam encontrado baixo desempenho da fórmula criada por Shine & Lal, tendo este índice diagnosticado corretamente somente 11% dos pacientes portadores de anemia ferropriva e 100% dos pacientes com  $\beta$ -talassemia menor. England & Fraser (1979) verificaram também que o Índice de Shine & Lal diagnosticou corretamente 100% dos pacientes portadores de  $\beta$ -talassemia menor, porém 100% dos pacientes com anemia ferropriva foram erroneamente classificados como  $\beta$ -talassêmicos menores. Também no estudo de Janel *et al.* (2011) foi verificado que o valor da área sob a curva ROC (0,770) do índice de Shine & Lal foi um dos menores dentre os índices testados, sendo este resultado semelhante ao observado no presente estudo. Entretanto, contrariando os resultados encontrados nos trabalhos acima citados, o estudo conduzido por Okan *et al.* (2009) obteve para a fórmula de Shine & Lal os maiores valores para o índice de Youden, tanto no grupo dos pacientes portadores de moderada a severa anemia ferropriva (88) quanto no grupo com leve a moderada anemia ferropriva (91).

Em relação à concordância dos índices com o método padrão-ouro para diagnóstico da anemia ferropriva e talassemias menores (ferritina sérica para a anemia ferropriva; eletroforese de hemoglobina para a  $\beta$ -talassemia menor e método molecular para o traço  $\alpha$ -talassêmico), foi observada uma excelente concordância dos Índices de Green & King, Índice do RDW e o Novo Índice, demonstrando sua boa aplicabilidade na prática clínica. O Índice de Sirdah apresentou boa concordância e os Índices de Ehsani, de Mentzer e de Srivastava, moderada concordância. Contudo, o Índice de Ricerca e principalmente o Índice de Shine & Lal apresentaram valores extremamente baixos

para o coeficiente *kappa* indicando ausência de concordância e, desta forma, não devem ser utilizados para o diagnóstico das anemias microcíticas estudadas.

Finalmente, cumpre ressaltar que ao nosso ver uma grande vantagem do Novo Índice sobre o Índice de Green & King, cujos resultados foram similares, consiste no fato de que a fórmula do primeiro índice (NI) não depende dos valores de RDW, os quais são obtidos apenas em contadores automáticos bastante modernos. Desta forma, o NI pode ser aplicado nas regiões onde os laboratórios não dispõem de tecnologias avançadas. Concluindo, o NI, por suas características de simplicidade, apresenta grande potencial de aplicação como ferramenta de *screening* para diferenciação entre anemia ferropriva e talassemias menores.

O uso dos índices não substitui os exames “padrão-ouro” no diagnóstico das anemias microcíticas e hipocrômicas. No entanto, cabe salientar que em determinadas condições de concomitância de doenças (por exemplo, anemia ferropriva e ADC), até mesmo os resultados dos exames padrão-ouro podem sofrer interferência da doença intercorrente, dificultando o diagnóstico. É bem conhecido que o diagnóstico da anemia ferropriva é particularmente alterado em pacientes com condições inflamatórias agudas ou crônicas porque a maioria dos marcadores bioquímicos do metabolismo do ferro é afetada pela reação de fase aguda (BRUGNARA, 2003). A interferência nos exames padrão-ouro de uma doença concomitante pode ser exemplificada pelo aumento da ferritina em pacientes com ADC o que poderia vir a mascarar uma anemia ferropriva em desenvolvimento; ou, também, a possível diminuição dos níveis de HbA<sub>2</sub> em um paciente portador de  $\beta$ -talassemia menor quando este apresenta simultaneamente a anemia ferropriva (EL-AGOUZA *et al.*, 2002; WEISS, 2002). A possibilidade de redução dos níveis de HbA<sub>2</sub> devido à anemia ferropriva levou Madan *et al.* (1998) a sugerir que para cada grupo populacional seria necessário avaliar a utilidade da dosagem de HbA<sub>2</sub> como um teste confirmatório para a presença de  $\beta$ -talassemia menor concomitantemente à anemia ferropriva.

Então, embora não seja possível alcançar um diagnóstico definitivo de anemia ferropriva ou talassemia menor baseando-se meramente nas funções discriminantes, estes simples cálculos podem ser potencialmente úteis no *screening* de pacientes com anemias microcíticas. O uso rotineiro de tais fórmulas poderia oferecer um

direcionamento para a escolha de testes laboratoriais confirmatórios com custos mais altos quando assim fosse necessário e evitar um tratamento inapropriado, resultando assim em significativa redução de gastos pelo sistema de saúde.

### **6.6 Potencial aplicação de índices em casos de concomitância de anemias microcíticas**

No grupo portador concomitantemente de anemia ferropriva e talassemia menor, composto de 42 pacientes, os resultados da aplicação dos três melhores índices, a saber Índice de Green & King, Índice do RDW e Novo Índice foram: 39, 40 e 38 pacientes diagnosticados como portadores de anemia ferropriva pelos Índices de Green & King, Índice do RDW e Novo Índice, respectivamente.

É conhecido que nem sempre se obtêm resultados totalmente fidedignos na aplicação das inúmeras fórmulas desenvolvidas com a finalidade de discriminar as causas de anemia microcítica e hipocrômica. Certamente, um dos motivos disso, é a concomitância de doenças que ocorre em muitos pacientes. Mentzer (1973) ao testar sua fórmula e o Índice de England & Fraser verificou que os pacientes portadores de talassemia menor foram erroneamente classificados como deficientes em ferro quando outras causas de anemia estavam presentes tais como hemólise, hemorragia ou gravidez. Este pesquisador verificou ainda que, em geral, doenças coexistentes que influenciam a contagem de eritrócitos tais como a doença pulmonar obstrutiva crônica caracterizada por policitemia, invalidam os Índices de England & Fraser e o seu próprio índice como parâmetros diagnósticos para anemia ferropriva e talassemia menor. Green & King (1989) também observaram que ao aplicar a função discriminante elaborada pelos mesmos em pacientes onde coexistiam anemia ferropriva e talassemia menor, esta indicava anemia ferropriva.

### **6.7 Limitações deste estudo**

Apesar das vantagens e facilidades da aplicação do NI na prática laboratorial, cabe ressaltar uma limitação desta e de outras fórmulas considerando que não são capazes de diferenciar anemia ferropriva de talassemias menores em todos os casos. À luz desse conhecimento, duas situações podem ocorrer e merecem atenção especial:

- A aplicação do índice indicou talassemias menores mas, o paciente é portador de anemia ferropriva. Neste caso, o acompanhamento do paciente faz-se necessário e indicará, ao longo do tempo, redução expressiva nos níveis de hemoglobina circulante, induzindo o médico à solicitação de exames investigatórios do metabolismo do ferro.
- A aplicação do índice indicou anemia ferropriva mas, o paciente é portador de talassemias menores. Nesta situação, também o acompanhamento do paciente se faz necessário e norteará a conduta médica. Neste caso, a prescrição de ferro não aumentaria o nível de hemoglobina sinalizando para um distúrbio genético.

Nos casos de concomitância de doenças, o acompanhamento também poderá esclarecer a melhor conduta médica a ser adotada. Portanto, o NI constitui uma ferramenta útil na orientação do médico quanto à conduta inicial a ser adotada; porém, não dispensa o acompanhamento do paciente que, eventualmente, poderá necessitar de exames confirmatórios para elucidar a forte suspeita levantada inicialmente por meio da aplicação deste simples índice.

Uma outra limitação do presente estudo se refere ao tamanho amostral analisado que estende os valores dos intervalos de confiança para sensibilidade no diagnóstico da talassemia menor e especificidade para o diagnóstico da anemia ferropriva. Indubitavelmente, para uma maior confiabilidade dos resultados apresentados faz-se obrigatória a aplicação do NI em populações maiores e distribuídas em diferentes partes do mundo.

Finalmente, outra limitação referente à aplicação do Novo Índice, seria seu cálculo para crianças, uma vez que tanto para seu desenvolvimento quanto para sua validação foram utilizadas populações adultas. Desta forma, não é possível interpretar seus valores neste caso. Para que sua aplicação em crianças seja confiável é necessário um estudo abrangendo indivíduos com idade inferior a 18 anos.

## 7 CONCLUSÕES

1) O Novo Índice (NI), juntamente com o Índice de Green & King e o Índice do RDW, apresentaram grande acurácia na discriminação entre anemia ferropriva e talassemias menores e excelente concordância com os métodos padrão-ouro de diagnóstico das referidas anemias, mostrando boa aplicabilidade na prática clínica;

2) O Novo Índice (NI) representa uma inovação na discriminação entre as duas anemias referidas acima, com potencialidade de ampla aplicação, considerando apresentar a vantagem de ser dependente apenas do número de hemácias e do CHCM;

3) A utilização do Novo Índice (NI) no diagnóstico diferencial entre as anemias ferropriva e talassemias menores apresenta, como vantagens, além do direcionamento do provável diagnóstico:

- a redução do tempo gasto por profissionais médicos e dos laboratórios na realização de técnicas de baixa sensibilidade para diagnóstico de talassemias, principalmente das  $\alpha$ -talassemias;
- Economia de recursos financeiros dispendiosos uma vez que análises moleculares estão disponíveis em pequeno número de laboratórios especializados e não constituem técnicas diagnósticas acessíveis à população em geral;
- Maior satisfação do paciente e equipe envolvida;

4) Uma minuciosa investigação em amostras de sangue de pacientes com anemia microcítica e hipocrômica, valendo-se de métodos moleculares, revelou uma frequência de  $\alpha$ -talassemia nos grupos de pacientes dos dois hospitais públicos do Estado de Minas Gerais, compatível com aquela descrita na literatura, o que indica a necessidade de introdução de tais métodos para diagnosticar corretamente casos específicos;

5) A comparação entre os resultados obtidos para diagnóstico de  $\alpha$ -talassemia quando foram utilizados diferentes métodos de investigação (Métodos moleculares x Métodos

convencionais), revelou a baixa sensibilidade dos métodos convencionais para o diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia em suas formas menores;

6) Diante dos resultados obtidos no presente estudo, presume-se que o desenvolvimento deste contribuiu, dentre outros aspectos, para aperfeiçoar o diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas valendo-se de um simples índice facilmente aplicável por aqueles que atuam em laboratórios clínicos, bem como para se conhecer a frequência da  $\alpha$ -talassemia em nosso meio, distúrbio esse, subdiagnosticado;

7) Finalmente, os resultados obtidos neste estudo permitem a aplicação do NI como ferramenta de triagem em laboratórios clínicos, porém havendo necessidade do uso de testes moleculares para confirmação de possíveis casos de talassemias em situações específicas.

## **PERSPECTIVAS**

A oportuna possibilidade de novos estudos em continuidade aos procedimentos iniciais de validação desenvolvidos no presente estudo poderá se tornar uma realidade, mediante estágio pós-doutoral previsto para ser realizado, sob a supervisão do Dr. Ralph Green (MD, PhD, FRCPath), autor do Índice de Green and King, na Universidade da Califórnia, Davis, a partir de janeiro de 2013. Contatos já foram efetuados entre a orientadora do presente estudo e o Dr. Green durante o XXXIV *World Congress of the International Society of Hematology*, em abril de 2012, no México.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

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

ANDERSON, G. J.; DARSHAN, D.; WILKINS, S. J.; FRAZER, D. M. Regulation of systemic iron homeostasis: how the body responds to changes in iron demand. **Biomaterials**, v. 20, n. 3-4, p. 665-674, 2007.

ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M.; McLAREN, G. D. Iron absorption and metabolism. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 25, n. 2, p. 129-135, 2009.

ANDREWS, N. C. The iron transporter DMT1. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 31, n. 10, p. 991-994, 1999.

ANDREWS, N. C.; SCHMIDT, P. J. Iron homeostasis. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 69-85, 2007.

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

ARAÚJO, A. S.; SILVA, W. A.; LEÃO, S. A.; BANDEIRA, F. C.; PETROU, M.; MODELL, B.; ZAGO, M. A. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. **Hemoglobin**, v. 27, n. 4, p. 211-217, 2003.

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

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B.; STOIAN, I. Heparin – central regulator of iron metabolism. **European Journal of Haematology**, v. 78, n. 1, p. 1-10, 2007.

BABITT, J. J.; HUANG, F. W.; WRIGHTING, D. M.; XIA, Y.; SIDIS, Y.; SAMAD, T. A.; CAMPAGNA, J. A.; CHUNG, R. T.; SCHNEYER, A. L.; WOOLF, C. J.; ANDREWS, N. C.; LIN, H. Y. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. **Nature Genetics**, v. 38, n. 5, p. 531-539, 2006.

BARBOUR, V. M.; TUFARELLI, C.; SHARPE, J. A.; SMITH, Z. E.; AYYUB, H.; HEINLEIN, C. A.; SLOANE-STANLEY, J.; INDRAK, K.; WOOD, W. G.; HIGGS, D. R.  $\alpha$ -Thalassemia resulting from a negative chromosomal position effect. **Blood**, v. 96, n. 3, p. 800-807, 2000.

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

BAYSAL, E.; HUISMAN, T. H. J. Detection of common deletional  $\alpha$ -thalassemia-2 determinants by PCR. **American Journal of Hematology**, v. 46, n. 3, p. 208-213, 1994.

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

BEAUMONT, C.; DELAUNAY, J.; HETET, G.; GRANDCHAMP, B.; MONTALEMBERT, M.; TCHEMIA, G. Two new human DMT-1 gene mutations in a patient with microcytic anemia, low ferritinemia, and liver iron overload. **Blood**, v. 107, n. 10, p. 4168-4170, 2006.

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

BELISARIO, A. R.; RODRIGUES, C. V.; MARTINS, M. L.; SILVA, C. M.; VIANA, M. B. coinheritance of  $\alpha$ -thalassemia decreases the risk of cerebrovascular disease in a cohort of children with sickle cell anemia. **Hemoglobin**, v. 34, n. 6, p. 516-529, 2010.

BERNINI, L. F.; HARTEVELD, C. L.  $\alpha$ -Thalassaemia. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 53-90, 1998.

BERTUZZO, C. S.; SONATI, M. F.; COSTA, F. F. Hematological phenotype and the type of  $\beta$  thalassemia mutation in Brazil. **Brazilian Journal of Genetics**, v. 20, n. 2, p. 319-321, 1997.

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

BEYAN, C.; KAPTAN, K.; IFRAN, A. Predictive value of discrimination indices in differential diagnosis of iron deficiency anemia and beta-thalassemia trait. **European Journal of Haematology**, v. 78, n. 6, p. 524-526, 2007.

BEZERRA, C. M. Diagnóstico molecular da talassemia  $\alpha^+$  (deleção  $-\alpha^{3.7}$ ) em indivíduos com microcitose e/ou hipocromia atendidos no Hemocentro Dalton Barbosa Cunha em Natal, Rio Grande do Norte. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32, n. 1, p. 90-91, 2010.

BILIC, E.; BILIC, E. Amino acid sequence homology of thrombopoietin and erythropoietin may explain thrombocytosis in children with iron deficiency anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, n. 8, p. 6756, 2003.

BORGES, E.; WENNING, M. R. S. C.; KIMURA, E. M.; GERVÁSIO, S. A.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F. High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia among individuals with microcytosis and hypochromia without anemia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34, n. 6, p. 759-762, 2001.

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

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

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

CAO, A.; GALANELLO, R. Beta-thalassemia. **Genetics in Medicine**, v. 12, n. 2, p. 61-76, 2010.

CHEN, F. E.; OOI, C.; HA, S. Y.; CHEUNG, B. M. Y.; TODD, D.; LIANG, R.; CHAN, T. K.; CHAN, V. Genetic and clinical features of hemoglobin H disease in Chinese patients. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 8, p. 544-550, 2000.

CHONG, S. S.; BOEHM, C. D.; HIGGS, D. R.; CUTTING, G. R. Single-tube multiplex-PCR screen for common deletional determinants of  $\alpha$ -thalassemia. **Blood**, v. 95, n. 1, p. 360-362, 2000.

CHUI, D. H. K. Alpha-thalassaemia and population health in Southeast Asia. **Annals of Human Biology**, v. 32, n. 2, p. 123-129, 2005.

CHUI, D. H. K.; WAYE, J. S. Hydrops fetalis caused by  $\alpha$ -thalassemia: an emerging health care problem. **Blood**, v. 91, n. 7, p. 2213-2222, 1998.

CLARK, B. E.; THEIN, S. L. Molecular diagnosis of hemoglobin disorders. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 26, n. 3, p. 159-176, 2004.

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

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

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

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

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

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

COUTO, F. D.; ALBUQUERQUE, A. B. L.; ADORNO, E. V.; NETO J. P. M.; FREITAS ABBEHUSEN, L. F.; OLIVEIRA, J. L. B.; REIS, M. G.; GONÇALVES, M. S. Alpha-thalassemia 2, 3.7 kb deletion and hemoglobin AC heterozygosity in pregnancy: a molecular and hematological analysis. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 25, n. 1, p. 29-34, 2003.

CULLIS, J. O. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. **British Journal of Haematology**, v. 154, n. 3, p. 289-300, 2011.

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

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

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. **Trends in Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 93-100, 2007.

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

EDISON, E. S.; BAJEL, A.; CHANDY, M. Iron homeostasis: new players, newer insights. **European Journal of Haematology**, v. 81, n. 6, p. 411-424, 2008.

EHSANI, M.; DARVISH, A.; ASLANI, A.; SEIGHALI, F. A new formula for differentiation of iron deficiency anemia (IDA) and thalassemia trait (TT). **Turkish Journal of Haematology**, v. 22, p. 268, 2005.

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

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

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

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

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

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

FEI, Y. J.; LIU, J. C.; WALKER, E. L.; HUISMAN, T. H. A new gene deletion involving the alpha 2-, alpha 1-, and theta 1-globin genes in a black family with Hb H disease. **American Journal of Hematology**, v. 39, n. 4, p. 299-300, 1992.

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

FERRARA, M.; CAPOZZI, L.; RUSSO, R.; BERTOCCO, F.; FERRARA, D. Reliability of red blood cell indices and formulas to discriminate between  $\beta$  thalassemia trait and iron deficiency in children. **Hematology**, v. 15, n. 2, p. 112-115, 2010.

FILHO, I. L. S.; GONÇALVES, M. S.; ADORNO, E. V.; CAMPOS, D. P.; FLEURY, M. K. Triagem de hemoglobinopatias e avaliação da degeneração oxidativa da hemoglobina em trabalhadores portadores do traço falciforme (HbAS), expostos a riscos ocupacionais. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, p. 183-187, 2005.

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

FISCHEL-GHODSIAN, N.; VICKERS, M. A.; SEIP, M.; WINICHAGOON, P.; HIGGS, D. R. Characterization of two deletions that remove the entire human zeta-alpha globin gene complex (-<sup>THAI</sup> and -<sup>FIL</sup>). **British Journal of Haematology**, v. 70, n. 2, p. 233-238, 1988.

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

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

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

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

FOGLIETTA, E.; DEIDDA, G.; GRAZIANI, B.; MODIANO, G.; BIANCO, I. Detection of  $\alpha$ -globin gene disorders by a simple PCR methodology. **Haematologica**, v. 81, n. 5, p. 387-396, 1996.

FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J. Iron Imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 289, n. 4, p. G631-G635, 2005.

FRESON, K.; MATTHIJS, G.; THYS, C.; MARIEN, P.; HOYLAERTS, M. F.; VERMYLEN, J.; VAN GEET, C. Different substitutions at residue D218 of the X-linked transcription factor GATA1 lead to altered clinical severity of macrothrombocytopenia and anemia and are associated with variable skewed X inactivation. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 2, p. 147-152, 2002.

GALANELLO, R.; ORIGA, R. Beta-thalassemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 11, p. 2-15, 2010.

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

GARSHASBI, M.; OBERKANINS, C.; LAW, H. Y.; NEISHABURY, M.; KARIMINEJAD, R.; NAJMABADI, H. Alpha-globin gene deletion and point mutation analysis among Iranian patients with microcytic hypochromic anemia. **Haematologica**, v. 88, n. 10, p. 1196-1197, 2003.

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

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

GROTTO, H. Z. W. Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, p. 0-0, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Fisiologia e metabolismo do ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, p. 0-0, 2010.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

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

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

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

HARTEVELD, C. L.; HIGGS, D. R.  $\alpha$ -Thalassaemia. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 5, n. 13, p. 1-21, 2010.

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

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

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

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

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

HIGGS, D. R.  $\alpha$ -thalassaemia. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 6, n. 1, p. 117-150, 1993.

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

HIGGS, D. R.; ENGEL, J. D.; STAMATOYANNOPOULOS, G. Thalassaemia. **Lancet**, v. 379, n. 9813, p. 373-383, 2012.

HIGGS, D. R.; VICKERS, M. A.; WILKIE, A. O.; PRETORIUS, I. M.; JARMAN, A. P.; WEATHERAL, D. J. A review of the molecular genetics of the human  $\alpha$  globin gene cluster. **Blood**, v. 73, n. 5, p. 1081-1104, 1989.

HIGGS, D. R.; WEATHERALL, D. J. The alpha thalassaemias. **Cellular and molecular life sciences**, v. 66, n. 7, p. 1154-1162, 2009.

HIGGS, D. R.; WOOD, W. G.; JARMAN, A. P.; SHARPE, J.; LIDA, J.; PRETORIUS, I. M.; AYYUB, H. A major positive regulatory region located far upstream of the human alpha-globin gene locus. **Genes & Development**, v. 4, n. 9, p. 1588-1601, 1990.

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

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

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

IOLASCON, A.; D'APOLITO, M.; SERVEDIO, V.; CIMMINO, F.; PIGA, A.; CAMASCHELLA, C. Microcytic anemia and hepatic iron overload in a child with compound heterozygous mutations in DMT-1 (SCL11A2). **Blood**, v. 107, n. 1, p. 349-354, 2006.

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

JANEL, A.; ROSZYK, L.; RAPATEL, C.; MAREYNAT, G.; BERGER, M. G.; SERRE-SAPIN, A. F. Proposal of a score combining red blood cell indices for early differentiation of beta-thalassemia minor from iron deficiency anemia. **Hematology**, v. 16, n. 2, p. 123-127, 2011.

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

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

KATTAMIS, A. C.; CAMASCHELLA, C.; SIVERA, P.; SURREY, S.; FORTINA, P. The human  $\alpha$ -thalassemia syndromes: detection of molecular defects. **American Journal of Hematology**, v. 53, n. 2, p. 81-91, 1996.

KAWABATA, H.; YANG, R.; HIRAMA, T.; VUONG, P. T.; KAWANO, S.; GOMBART, A. F.; KOEFFLER, H. P. Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 30, p. 20826-20832, 1999.

KILLIP, S.; BENNETT, J. M.; CHAMBERS, M. D. Iron deficiency anemia. **American Family Physician**, v. 75, n. 5, p. 671-678, 2007.

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

KRAUSE, A.; NEITZ S.; MÄGERT, H. J.; SCHULZ, A.; FORSSMANN, W. G.; SCHULZ-KNAPPE, P.; ADERMANN, K. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. **FEBS letters**, v. 480, n. 2-3, p. 147-150, 2000.

KUKU, I.; KAYA, E.; YOLOGLU, S.; GOKDENIZ, R.; BAYDIN, A. Platelet counts in adults with iron deficiency anemia. **Platelets**, v. 20, n. 6, p. 401-405, 2009.

LABBÉ, R. F.; DEWANJI, A. Iron assessment tests: transferrin receptor vis-à-vis zinc protoporphyrin. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 3, p. 165-174, 2004.

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

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

LAFFERTY, J. D.; BARTH, D. S.; SHERIDAN, B. L.; MCFARLANE, A. G.; HALCHUK, L. M.; CROWTHER, M. A. Prevalence of thalassemia in patients with microcytosis referred for hemoglobinopathy investigation in Ontario. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 127, n. 2, p. 192-196, 2007.

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

LEUNG, W. C.; LEUNG, K. Y.; LAU, E. T.; TANG, M. H. Y.; CHAN, V. Alpha-thalassaemia. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, v. 13, n. 4, p. 215-222, 2008.

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

LIU, K.; KAFFES, A. J. Iron deficiency anaemia: a review of diagnosis, investigation and management. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 24, n. 2, p. 109-116, 2012.

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

LIU, Y. T.; OLD, J. M.; MILES, K.; FISHER, C. A., WEATHERALL, D. J.; CLEGG, J. B. Rapid detection of  $\alpha$ -thalassaemia deletions and  $\alpha$ -globin gene triplication by multiplex polymerase chain reactions. **British Journal of Haematology**, v. 108, n. 2, p. 295-299, 2000.

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

MADAN, N.; SIKKA, M.; SHARMA, S.; RUSIA, U. Phenotypic expression of hemoglobin A<sub>2</sub> in beta-thalassemia trait with iron deficiency. **Annals of Hematology**, v. 77, n. 3, p. 93-96, 1998.

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

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

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

MATOS, J. F. Anemias microcíticas e hipocrômicas: diagnóstico diferencial. 2007. 149f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

MCKIE, A. T.; BARROW, D.; LATUNDE-DADA, G. O.; ROLFS, A.; SAGER, G.; MUDALY, E.; MUDALY, M.; RICHARDSON, C.; BARLOW, D.; BOMFORD, A.; PETERS, T. J.; RAJA, K. B.; SHIRALI, S.; HEDIGER, M. A.; FARZANEH, F.; ROBERT J. SIMPSON, R. J. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. **Science**, v. 291, n. 5509, p. 1755-1759, 2001.

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

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

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

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

METZGEROTH, G.; ADELBERGER, V.; DORN-BEINEKE, A.; KUHN, C.; SCHATZ, M.; MAYWALD, O.; BERTSCH, T.; WISSER, H.; HEHLMANN, R.; HASTKA, J. Soluble transferrin receptor and zinc protoporphyrin – competitors or efficient partners? **European Journal of Haematology**, v. 75, n. 4, p. 309-317, 2005.

MIMS, M. P.; GUAN, Y.; POSPISILOVA, D.; PRIWITZEROVA, M.; INDRAK, K.; PONKA, P.; DIVOKY, V.; PRCHAL, J. T. Identification of a human mutation of DMT-1 in a patient with microcytic anemia and iron overload. **Blood**, v. 105, n. 3, p. 1337-1342, 2005.

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

MOCKENHAUPT, F. P.; EHRHARDT, S.; GELLERT, S.; OTCHWEMAH, R. N.; DIETZ, E. ANEMANA, S. D.; BIENZLE, U.  $\alpha^+$ -thalassemia protects African children from severe malaria. **Blood**, v. 104, n. 7, p. 2003-2006, 2004.

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

NAIRZ, M.; WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 118, n. 15-16, p. 442-462, 2006.

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

NEMETH, E.; GANZ, T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. **Annual review of nutrition**, v. 26, p. 323-342, 2006.

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

NICHOLLS, R. D.; HIGGS, D. R.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J.  $\alpha^0$ -thalassemia due to recombination between the  $\alpha_1$ -globin gene and an Alu I repeat. **Blood**, v. 65, n. 6, p. 1434-1438, 1985.

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

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

NTAIOS, G.; CHATZINIKOLAOU, A.; SAOULI, Z.; GIRTOVITIS, F.; TSAPANIDOU, M.; KAIIFA, G.; KONTONINAS, Z.; NIKOLAIDOU, A.; SAVOPOULOS, C.; PIDONIA, I.; ALEXIOU-DANIEL, S. Discrimination indices as screening tests for beta-thalassemic trait. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 7, p. 487-491, 2007.

OHGAMI, R. S.; CAMPAGNA, D. R.; GREER, E. L.; ANTIOCHOS, B.; MCDONALD, A.; CHEN, J.; SHARP, J. J.; FUJIWARA, Y.; BARKER, J. E.; FLEMING, M. D. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 11, p. 1264-1269, 2005.

OKAN, V.; CIGILOGLU, A.; CIFCI, S.; YILMAZ, M.; PEHLIVAN, M. Red cell indices and functions differentiating patients with the  $\beta$ -thalassaemia trait from those with iron deficiency anaemia. **The Journal of International Medical Research**, v. 37, n. 1, p. 25-30, 2009.

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

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

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

ORKIN, S. H.; MICHELSON, A. Partial deletion of the  $\alpha$ -globin structural gene in human  $\alpha$ -thalassaemia. **Nature**, v. 286, n. 5772, p. 538-540, 1980.

ORLANDO, G. M.; NAOUM, P. C.; SIQUEIRA, F. A. M.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Diagnóstico diferencial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 22, n. 2, p. 111-121, 2000.

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

PANIGRAHI, I.; AGARWAL, S. Genetic determinants of phenotype in beta-thalassemia. **Hematology**, v. 13, n. 4, p. 247-252, 2008.

PARK, C. H.; VALORE, E. V.; WARING, A. J.; GANZ, T. Heparin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 11, p. 7806-7810, 2001.

PASRICHA, S. R.; FLECKNOE-BROWN, S. C.; ALLEN, K. J.; GIBSON, P. R.; MCMAHON, L. P.; OLYNYK, J. K.; ROGER, S. D.; SAVOIA, H. F.; TAMPI, R.; THOMSON, A. R.; WOOD, E. M.; ROBINSON, K. L. Diagnosis and management of iron deficiency anaemia: a clinical update. **The Medical Journal of Australia**, v. 193, n. 9, p. 525-532, 2010.

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

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

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

PORNPRASERT, S.; PHUSUA, A.; SUANTA, S.; SAETUNG, R.; SANGUANSEMSRI, T. Detection of alpha-thalassemia-1 Southeast Asian type using real-time gap-PCR with

SYBR Green1 and high resolution melting analysis. **European Journal of Haematology**, v. 80, n. 6, p. 510-514, 2008.

PRESSLEY, L.; HIGGS, D. R.; ALDRIDGE, B.; METAXATOU-MAVROMATI, A.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. Characterisation of a new  $\alpha$  thalassemia 1 defect due to a partial deletion of the alpha globin gene complex. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 21, p. 4889-4898, 1980.

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

RACKE, F. K. EPO e TPO sequences do not explain thrombocytosis in iron deficiency anemia. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 25, n. 11, p. 919, 2003.

RAJ, D. S. C. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. **Seminars in arthritis and rheumatism**, March 11, 2008.

REICHERT, V. C.; DE CASTRO, S. M.; WAGNER, S. C.; DE ALBUQUERQUE, D. M.; HUTZ, M. H.; LEISTNER-SEGAL, S. Identification of  $\beta$  thalassemia mutations in South Brazilians. **Annals of Hematology**, v. 87, n. 5, p. 381-384, 2008.

RICERCA, B. M.; STORTI, S.; D'ONOFRIO, G.; MANCINI, S.; VITTORI, M.; CAMPISI, S.; MANGO, G.; BIZZI, B. Differentiation of iron deficiency from thalassaemia trait: a new approach. **Haematologica**, v. 72, n. 5, p. 409-413, 1987.

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

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

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

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

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

SEIXAS, F. A. V.; SILVA, C. D.; TOMINAGA, J.; FERRO, O. C.; NILSON, L. G. Incidence of hemoglobinopathies in Northwest Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, n. 4, p. 287-291, 2008.

SHAJI, R. V.; EUNICE, S. E.; BAIDYA, S.; SRIVASTAVA, A.; CHANDY, M. Determination of the breakpoint and molecular diagnosis of a common  $\alpha$ -thalassemia-1 deletion in the Indian population. **British Journal of Haematology**, v. 123, n. 5, p. 942-947, 2003.

SHALMON, L.; KIRSCHMANN, C.; ZAIZOV, R. A new deletional  $\alpha$ -thalassemia detected in Yemenites with hemoglobin H disease. **American Journal of Hematology**, v. 45, n. 3, p. 201-204, 1994.

SHARP, P.; SRAI, S. K. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. **World Journal of Gastroenterology**, v. 13, n. 35, p. 4716-4724, 2007.

SHAYEGHI, M.; LATUNDE-DADA, G. O.; OAKHILL, J. S.; LAFTAH, A. H.; TAKEUCHI, K.; NEIL HALLIDAY, N.; KHAN, Y.; WARLEY, A.; McCANN, F. E.; HIDER, R. C.; FRAZER, D. M.; ANDERSON, G. J.; VULPE, C. D.; SIMPSON, R. J.; McKIE, A. T. Identification of an intestinal heme transporter. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 789-801, 2005.

SHEN, C.; JIANG, Y.; SHI, H.; LIU, J.; ZHOU, W.; DAI, Q.; YANG, H. Evaluation of indices in differentiation between iron deficiency anemia and  $\beta$ -thalassemia trait for chinese children. **Journal of Pediatric Hematology/Oncology**, v. 32, n. 6, p. e218-e222, 2010.

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

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

SIAH, C. W.; OMBIGA, J.; ADAMS, L. A.; TRINDER, D.; OLYNYK, J. K. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **The Clinical Biochemist. Reviews**, v. 27, n. 1, p. 5-16, 2006.

SILVEIRA, Z. M. L.; BARBOSA, M. V.; FERNANDES, T. A. A. M.; KIMURA, E. M.; COSTA, F. F.; SONATI, M. F.; REBECCHI, I. M. M.; MEDEIROS, T. M. D. Characterization of beta-thalassemia mutations in patients from the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 34, n. 3, p. 425-428, 2011.

SINGER, S. T. Variable clinical phenotypes of alpha-thalassemia syndromes. **TheScientificWorldJournal**, v. 9, p. 615-625, 2009.

SINGSANAN, S.; FUCHAROEN, G.; SAVONGSY, O.; SANCHAISURIYA, K.; FUCHAROEN, S. Molecular characterization and origins of Hb Constant Spring and Hb Paksé in Southeast Asian populations. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 9, p. 665-669, 2007.

SIRDAH, M.; TARAZI, I.; AL NAJJAR, E.; AL HADDAD, R. Evaluation of the diagnostic reliability of different RBC indices and formulas in the differentiation of the beta-thalassaemia minor from iron deficiency in Palestinian population. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 30, n. 4, p. 324-330, 2008.

SIVERA, P.; ROETTO, A.; MAZZA, U.; CAMASCHELLA, C. Feasibility of molecular diagnosis of  $\alpha$ -thalassemia in the evaluation of microcytosis. **Haematologica**, v. 82, n. 5, p. 592-593, 1997.

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

SKOGERBOE, K. J.; WEST, S. F.; SMITH, C.; TERASHITA, S. T.; LECRONE, C. N.; DETTER, J. C.; TAIT, J. F. Screening for alpha-thalassemia. Correlation of hemoglobin H inclusion bodies with DNA-determined genotype. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 116, n. 10, p. 1012-1018, 1992.

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

SONATI, M. F.; FARAH, S. B.; RAMALHO, A. S.; COSTA, F. F. High prevalence of  $\alpha$ -thalassemia in a black population of Brazil. **Hemoglobin**, v. 15, n. 4, p. 309-311, 1991.

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

SRIVASTAVA, P. C. Differentiation of thalassaemia minor from iron deficiency. **Lancet**, v. 2, n. 7821, p. 154-155, 1973.

SURA, T.; TRACHOO, O.; VIPRAKASIT, V.; VATHESATOGKIT, P.; TUNTEERATUM, A.; BUSABARATANA, M.; WISED PANICHKIJ, R.; ISARANQKURA, P. Hemoglobin H disease induced by the common SEA deletion and the rare hemoglobin Quong Sze in a Thai female: longitudinal clinical course, molecular characterization, and development of a PCR/RFLP-based detection method. **Annals of Hematology**, v. 86, n. 9, p. 659-663, 2007.

SZKLO, M.; NIETO, J. **Epidemiology: beyond the basics**. 2ed. 2000.

TAN, A. S. C.; QUAH, T. C.; LOW, P. S.; CHONG, S. S. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for  $\alpha$ -thalassemia. **Blood**, v. 98, n. 1, p. 250-251, 2001.

TANG, D. C.; FUCHAROEN, S.; DING, I.; RODGERS, G. P. Rapid differentiation of five common  $\alpha$ -thalassemia genotypes by polymerase chain reaction. **The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 137, n. 4, p. 290-295, 2001.

TANG, W.; LUO, H. Y.; ENG, B.; WAYE, J. S.; CHUI, D. H. K. Immunocytological test to detect adult carriers of (--SEA/) deletional  $\alpha$ -thalassaemia. **Lancet**, v. 342, n. 8880, p. 1145-1147, 1993.

TANGVARASITTICHAJ, O.; JEENAPONGSA, R.; SITTHIWORANAN, C.; SANGUANSEMSRI, T. Laboratory investigations of Hb Constant Spring. **Clinical and Laboratory Haematology**, v. 27, n. 1, p. 47-49, 2005.

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

THEIN, S. L. Beta-thalassaemia. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 91-126, 1998.

THEIN, S. L. Genetic insights into the clinical diversity of  $\beta$  thalassaemia. **British Journal of Haematology**, v. 124, n. 3, p. 264-274, 2004.

THEIN, S. L.; WALLACE, R. B.; PRESSLEY, L.; CLEGG, J. B.; WEATHERALL, D. J. HIGGS, D. R. The polyadenylation site mutation in the alpha-globin gene cluster. **Blood**, v. 71, n. 2, p. 313-319, 1988.

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

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

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

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

UMBREIT, J. Iron deficiency: a concise review. **American Journal of Hematology**, v. 78, n. 3, p. 225-231, 2005.

URBINATI, F.; MADIGAN, C.; MALIK, P. Pathophysiology and therapy for haemoglobinopathies. Part II: thalassaemias. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 8, n. 10, p. 1-26, 2006.

VIANA-BARACIOLI, L. M. S.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; PAGLIUSI, R. A.; NAOUM, P. C. Prevenção de hemoglobinopatias a partir de do estudo em gestantes. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 23, n. 1, p. 31-39, 2001.

VICHINSKY, E. P. Alpha thalassemia major – new mutations, intrauterine management, and outcomes. **Hematology**, p. 35-41, 2009.

VILLEGAS, A.; CALERO, F.; VICKERS, M. A.; AYYUB, H.; HIGGS, D. R. Alpha thalassaemia in two Spanish families. **European Journal of Haematology**, v. 44, n. 2, p. 109-115, 1990.

VIPRAKASIT, V.; AYYUB, H.; MAY, A. Dinucleotide deletion in  $-\alpha^{3.7}$  allele causes a severe form of  $\alpha^+$  thalassaemia. **European Journal of Haematology**, v. 71, n. 2, p. 133-136, 2003.

VIPRAKASIT, V.; GIBBONS, R. J.; BROUGHTON, B. C.; TOLMIE, J. L.; BROWN, D.; LUNT, P.; WINTER, R. M.; MARINONI, S.; STEFANINI, M.; BRUETON, L.; LEHMANN, A. R.; HIGGS, D. R. Mutations in the general transcription factor TFIIH result in beta-thalassemia in individuals with trichothiodystrophy. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 24, p. 2797-2802, 2001.

WAGNER, S. C.; CASTRO, S. M.; GONZALEZ, T. P.; SANTIN, A. P.; FILIPPON, L.; ZALESKI, C. F.; AZEVEDO, L. A.; AMORIN, B.; CALLEGARI-JACQUES, S. M.; HUTZ, M. H. Prevalence of common  $\alpha$ -thalassemia determinants in south Brazil: Importance for the diagnosis of microcytic anemia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 4, p. 641-645, 2010.

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

WAYE, J. S.; CHUI, D. H. K. The  $\alpha$ -globin gene cluster: genetics and disorders. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 24, n. 2, p. 103-109, 2001.

WAYE, J. S.; ENG, B.; CHUI, D. H. Identification of an extensive zeta-alpha globin gene deletion in a Chinese individual. **British Journal of Haematology**, v. 80, n. 3, p. 378-380, 1992.

WEATHERALL, D. J. Pathophysiology of thalassemia. **Baillière's Clinical Haematology**, v. 11, n. 1, p. 127-146, 1998.

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

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

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

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

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

WESSLING-RESNICK, M. Iron Imports. III. Transfer of iron from the mucosa into circulation. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 290, n. 1, p. G1-G6, 2006.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Disponível em: <<http://www.who.int/nutrition/topics/ida/en/index.html>> Acesso em: 15 mar2012.

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

WORWOOD, M. Serum transferrin receptor assays and their application. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 39, pt. 3, p. 221-230, 2002.

YADAV, D.; CHANDRA, J.; SHARMA, S.; SINGH, V. Clinicohematological study of thrombocytosis. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 77, n. 6, p. 643-647, 2010.

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

YUREGIR, G. T.; AKSOY, K.; CURUK, M. A.; DIKMEN, N.; FEI, Y. J.; BAYSAL, E.; HUISMAN, T. H. Hb H disease in a Turkish family resulting from the interaction of a deletional alpha-thalassaemia-1 and a newly discovered poly A mutation. **British Journal of Haematology**, v. 80, n. 4, p. 527-532, 1992.

ZAGO, M. A.; COSTA, F. F. Hereditary haemoglobin disorders in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 3, p. 385-388, 1985.

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

ZHANG, A.; ENNS, C. A. Iron homeostasis: recently identified proteins provide insight into novel control mechanisms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 2, p. 711-715, 2009.

ZIMMERMANN, M. B. Methods to assess iron and iodine status. **British Journal of Nutrition**, v. 99, s. 3, s2-s9, 2008.

## ANEXO A - Desenvolvimento do Novo Índice (NI)

### CONSTRUINDO E AVALIANDO ÍNDICES DE DISCRIMINAÇÃO DO TIPO DE ANEMIA EM PACIENTES UTILIZANDO VARIÁVEIS DO HEMOGRAMA, POR MEIO DE ANÁLISE DISCRIMINANTE LINEAR DE FISHER E REAMOSTRAGEM *BOOTSTRAP*

Ricardo Luiz Vilela de Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Bacharel em Estatística pela Universidade Federal de Minas Gerais e Analista de Políticas Públicas do Hospital Municipal Odilon Behrens.

#### Introdução

Este estudo teve como objetivo construir, pelo menos, um novo índice de predição do tipo de anemia em pacientes usando variáveis do hemograma e comparar os resultados deste(s) índice(s) com outros índices descritos na literatura.

Primeiramente foi utilizada uma amostra de 106 pacientes para a estimação dos índices e, em seguida, foi utilizada outra amostra, de 185 pacientes, para a validação destes índices e comparação com os demais da literatura, através, principalmente, da área sob a curva ROC (ZOU, 2007), bem como a máxima proporção de acertos, sensibilidade, especificidade (AGRESTI, 2002) e coeficiente *kappa* de concordância (COHEN, 1960).

Os métodos utilizados para o desenvolvimento deste índice foram a análise discriminante de Fisher (linear) e a análise discriminante não linear (MINGOTI, 2005). Com o primeiro banco, foram construídos índices com todas as combinações lineares das variáveis do hemograma (uma a uma variável, duas a duas, três a três, quatro a quatro, cinco a cinco e com as seis variáveis) e com todas as combinações não lineares das variáveis do hemograma, duas a duas. Foi decidido não utilizar o modelo não linear para índices com mais de duas variáveis porque o índice ficaria com uma equação muito complexa com, pelo menos, nove termos.

## A distribuição normal e a função discriminante

Ambos os métodos (linear e não linear) pressupõem que as variáveis possuem distribuição normal multivariada ou, pelo menos, uma distribuição não muito diferente da normal (MAGALHÃES, 2011).

Assume-se que uma variável aleatória  $X$  tem distribuição normal quando esta possui uma função de densidade de probabilidades (fdp) dada pela equação (MAGALHÃES, 2011):

$$f_X(x) = \frac{e^{-\frac{1}{2}\left(\frac{x-\mu}{\sigma}\right)^2}}{\sigma\sqrt{2\pi}},$$

Onde  $\mu$  e  $\sigma$  são a média e o desvio padrão da variável  $X$ , respectivamente.

Suponha-se um caso em que haja uma mistura de duas populações (no conceito estatístico de população), como no caso das anemias ferropriva e talassemias menores. Os indivíduos com anemia ferropriva vêm de uma população com determinada variável do hemograma com média  $\mu_1$  e desvio padrão  $\sigma_1$ , enquanto os indivíduos com talassemia vêm de outra população, com média  $\mu_2$  e desvio padrão  $\sigma_2$ . Assim, a análise discriminante, neste caso, simplesmente consiste em calcular e comparar em qual das duas populações determinado indivíduo tem maior probabilidade de pertencer, ou seja, possui maior função de densidade de probabilidade (MINGOTI, 2005).

Uma maneira direta de fazer esta comparação é dividir  $f_{x_1}$  por  $f_{x_2}$ , e avaliar se o resultado é maior ou menor que 1.

$$\lambda(x) = \frac{f_{x_1}(x)}{f_{x_2}(x)}$$

Se  $\lambda(x) > 1$ , infere-se que a observação pertence à população 1. Se  $\lambda(x) < 1$ , à população 2. Se  $\lambda(x) = 1$ , significa que a densidade de probabilidade é a mesma em ambas as populações, portanto, é possível escolher qualquer uma das duas populações.

Vale ressaltar que o critério para a tomada de decisão pode ser diferente de 1, caso seja considerado que um tipo de erro de classificação seja mais grave que o outro, ou se a distribuição *a priori* destas populações seja diferente. Um exemplo da primeira exceção seria quando a população 1 for de pessoas com determinada doença e a

população 2 de pessoas sem esta doença. Assim, é preferível classificar erroneamente uma observação da população 2 (não doente) como sendo da população 1 (doente) do que classificar uma observação da população 1 (doente) como sendo da população 2 (não doente). Neste caso, seria melhor escolher um ponto de corte menor que 1, ou seja, a população 2 só seria escolhida caso a densidade de probabilidade da observação fosse bem maior na fdp de  $X_2$  que na fdp de  $X_1$ .

População=

1 se  $\lambda(x) > c$

2 se  $\lambda(x) < c$

1 ou 2 se se  $\lambda(x) = c$ ,

onde  $c < 1$ .

A segunda exceção seria, por exemplo, quando a população de doentes for muito menor que a de não doentes. Por exemplo, se a frequência de doentes for de 1% e a de não doentes de 99%. Também seria melhor tomar um ponto de corte  $c$  menor que 1, e os critérios de classificação iguais aos mostrados na primeira exceção.

Entretanto, geralmente tem-se em mãos mais de uma variável, e é justamente neste caso que se torna mais necessário um método de classificação dos indivíduos. Assim, no caso de  $p$  variáveis utiliza-se a seguinte notação vetorial. Seja  $\mathbf{X} = (X_1, X_2, \dots, X_p)'$  o vetor aleatório composto pelas  $p$  variáveis aleatórias,  $\boldsymbol{\mu} = (\mu_1, \mu_2, \dots, \mu_p)'$  o vetor de médias destas  $p$  variáveis e  $\boldsymbol{\Sigma}$  a matriz de covariâncias destas  $p$  variáveis. A matriz de covariâncias é composta pelas variâncias de cada variável e pelas covariâncias de cada par de variáveis, da seguinte forma: o elemento da linha  $i$  e da coluna  $j$  da matriz, onde  $i \neq j$ , representa a covariância das variáveis  $X_i$  e  $X_j$ . Se  $i = j$ , o elemento representa a própria variância da variável  $X_i$ , e, portanto, a diagonal da matriz  $\boldsymbol{\Sigma}$  representa as variâncias das variáveis. Como  $\text{cov}(X_i, X_j) = \text{cov}(X_j, X_i)$ , a matriz  $\boldsymbol{\Sigma}$  é simétrica em torno de sua diagonal.

Tendo definido a notação do caso multivariado, é possível construir a função de densidade de probabilidade da normal multivariada (MINGOTI, 2005), que é:

$$f_X(X) = \frac{e^{-\frac{1}{2}(X-\mu)' \Sigma^{-1}(X-\mu)}}{|\Sigma|^{1/2} (2\pi)^{p/2}}$$

Onde  $|\Sigma|$  é o determinante da matriz  $\Sigma$  e o símbolo  $(X - \mu)'$  significa o vetor transposto do vetor  $(X - \mu)$ .

E no caso da análise discriminante, temos um vetor de médias  $\mu_1$  e  $\mu_2$  para cada população, assim como uma matriz de covariâncias  $\Sigma_1$  e  $\Sigma_2$  também para cada população. Assim, a função discriminante fica sendo (MINGOTI, 2005):

$$\lambda(X) = \frac{\left( \frac{e^{-\frac{1}{2}(X-\mu_1)' \Sigma_1^{-1}(X-\mu_1)}}{|\Sigma_1|^{1/2} (2\pi)^{p/2}} \right)}{\left( \frac{e^{-\frac{1}{2}(X-\mu_2)' \Sigma_2^{-1}(X-\mu_2)}}{|\Sigma_2|^{1/2} (2\pi)^{p/2}} \right)}$$

$$-2 \ln(\lambda(X)) = -2 \ln \left( \frac{e^{-\frac{1}{2}(X-\mu_1)' \Sigma_1^{-1}(X-\mu_1)}}{|\Sigma_1|^{1/2} (2\pi)^{p/2}} \right) + 2 \ln \left( \frac{e^{-\frac{1}{2}(X-\mu_2)' \Sigma_2^{-1}(X-\mu_2)}}{|\Sigma_2|^{1/2} (2\pi)^{p/2}} \right)$$

E que pode ser simplificada para

$$-2 \ln(\lambda(X)) = [(X - \mu_1)' \Sigma_1^{-1} (X - \mu_1)] - [(X - \mu_2)' \Sigma_2^{-1} (X - \mu_2)] + \ln(|\Sigma_1|) - \ln(|\Sigma_2|)$$

Quando as matrizes de covariâncias das duas populações são ( $\Sigma_1 = \Sigma_2 = \Sigma$ ) é possível chegar à equação de uma reta, que é o que se denomina discriminante linear de Fisher (FISHER, 1936):

$$fd(X) = (\mu_1 - \mu_2)' \Sigma^{-1} X - \frac{1}{2} (\mu_1 - \mu_2)' \Sigma^{-1} (\mu_1 + \mu_2)$$

Onde o critério de classificação seria: se  $fd(X) > 0$ , a observação é classificada como da população 2, e caso contrário como da população 1.

Antes de avaliar se as variáveis do hemograma têm ou não distribuição normal, vale ressaltar que o fato de determinada variável não possuir distribuição normal não impede o uso do método acima. É claro que se a distribuição das variáveis for conhecida, é possível construir outra função discriminante, com a fdp da distribuição referida no lugar da fdp da distribuição normal, e o índice construído com esta função discriminante seria melhor que o construído com a função que utiliza a distribuição normal. O problema é que é quase impossível saber qual a distribuição dos dados, caso

as variáveis não tenham distribuição normal. Além disso, como existe um banco para a construção do índice e outro para a validação, caso a suposição de normalidade dos dados seja muito falha, os índices construídos não terão um bom resultado com o banco de validação.

Foi realizado o teste de normalidade Shapiro-Wilk (SHAPIRO, 1965) nas seis variáveis, para cada tipo de anemia, e apenas as variáveis VCM, HCM e CHCM apresentaram valor-p maior que 0,05. Entretanto, foi decidido não ser tão rigoroso e trabalhar com todas as variáveis, por dois motivos: 1) o tamanho da amostra é pequeno, portanto, sensível a qualquer pequeno desvio da normalidade ou valor extremo e, 2) uma vez que existe um banco de dados para ajustar os modelos e um banco maior para validar, caso o desvio da normalidade seja realmente influente na qualidade do modelo, fica quase impossível ajustar um bom modelo com variáveis não normais e este modelo também ser bem avaliado com o banco de validação.

### Resultados com o banco de 106 pacientes (índices construídos)

Como já foi explicado, decidiu-se, por simplicidade, apenas considerar o modelo não linear nos casos de duas variáveis. Assim, foram construídos 63 modelos lineares e 15 não lineares, e seus resultados encontram-se nas tabelas abaixo.

ID	Variáveis	Modelo	área sob a curva ROC	máxima proporção de acertos	sensibilidade (máxima prop. de acertos)	especificidade (máxima prop. de acertos)	kappa (máxima prop. de acertos)
1	Global	linear	0,58	0,80	1,00	0,13	0,13
2	Hm	linear	0,86	0,89	0,95	0,65	0,64
3	Hb	linear	0,88	0,92	0,98	0,74	0,76
4	MCV	linear	0,73	0,81	0,93	0,39	0,36
5	MCH	linear	0,60	0,78	1,00	0,00	NA
6	MCHC	linear	0,66	0,78	1,00	0,04	0,00
7	Global; Hm	linear	0,89	0,87	0,98	0,78	0,54
8	Global; Hm	não-linear	0,89	0,87	0,98	0,78	0,54
9	Global; Hb	linear	0,91	0,91	1,00	0,57	0,67
10	Global; Hb	não-linear	0,91	0,91	0,98	0,48	0,67
11	Global; MCV	linear	0,75	0,83	0,96	0,35	0,38
12	Global; MCV	não-linear	0,75	0,83	0,94	0,26	0,38
13	Global; MCH	linear	0,62	0,80	1,00	0,13	0,13
14	Global; MCH	não-linear	0,62	0,80	1,00	0,13	0,13
15	Global; MCHC	linear	0,68	0,80	1,00	0,17	0,13
16	Global; MCHC	não-linear	0,68	0,80	1,00	0,17	0,13
17	Hm; Hb	linear	0,88	0,92	0,94	0,87	0,78
18	Hm; Hb	não-linear	0,88	0,92	0,94	0,87	0,78
19	Hm; MCV	linear	0,85	0,87	1,00	0,74	0,50
20	Hm; MCV	não-linear	0,85	0,87	1,00	0,70	0,50
21	Hm; MCH	linear	0,88	0,92	0,94	0,87	0,78

22	Hm; MCH	não-linear	0,88	0,92	0,93	0,83	0,78
23	Hm; MCHC	linear	0,90	0,94	0,98	0,83	0,83
24	Hm; MCHC	não-linear	0,90	0,94	0,95	0,74	0,83
25	Hb; MCV	linear	0,89	0,92	0,95	0,78	0,75
26	Hb; MCV	não-linear	0,89	0,92	0,95	0,78	0,75
27	Hb; MCH	linear	0,88	0,93	0,99	0,74	0,79
28	Hb; MCH	não-linear	0,88	0,93	0,98	0,70	0,79
29	Hb; MCHC	linear	0,87	0,92	0,98	0,74	0,73
30	Hb; MCHC	não-linear	0,87	0,92	0,96	0,65	0,73
31	MCV; MCH	linear	0,81	0,84	0,95	0,43	0,45
32	MCV; MCH	não-linear	0,81	0,84	0,94	0,39	0,45
33	MCV; MCHC	linear	0,81	0,84	0,95	0,43	0,45
34	MCV; MCHC	não-linear	0,81	0,84	0,95	0,43	0,45
35	MCH; MCHC	linear	0,82	0,84	0,95	0,43	0,45
36	MCH; MCHC	não-linear	0,82	0,84	0,95	0,43	0,45
37	Global; Hm; Hb	linear	0,91	0,91	0,94	0,83	0,72
38	Global; Hm; MCV	linear	0,89	0,88	0,89	0,83	0,67
39	Global; Hm; MCH	linear	0,91	0,91	0,92	0,87	0,74
40	Global; Hm; MCHC	linear	0,94	0,92	0,98	0,74	0,76
41	Global; Hb; MCV	linear	0,93	0,92	0,99	0,70	0,72
42	Global; Hb; MCH	linear	0,91	0,91	0,93	0,87	0,73
43	Global; Hb; MCHC	linear	0,91	0,90	1,00	0,52	0,63
44	Global; MCV; MCH	linear	0,84	0,85	0,98	0,52	0,45
45	Global; MCV; MCHC	linear	0,84	0,85	0,98	0,52	0,45
46	Global; MCH; MCHC	linear	0,84	0,85	0,95	0,52	0,49
47	Hm; Hb; MCV	linear	0,91	0,92	0,99	0,65	0,72
48	Hm; Hb; MCH	linear	0,87	0,92	0,99	0,87	0,72
49	Hm; Hb; MCHC	linear	0,90	0,91	0,95	0,74	0,71
50	Hm; MCV; MCH	linear	0,90	0,92	0,99	0,65	0,72
51	Hm; MCV; MCHC	linear	0,90	0,92	0,99	0,65	0,72
52	Hm; MCH; MCHC	linear	0,90	0,92	0,99	0,65	0,72
53	Hb; MCV; MCH	linear	0,91	0,91	0,99	0,74	0,68
54	Hb; MCV; MCHC	linear	0,91	0,91	0,99	0,74	0,68
55	Hb; MCH; MCHC	linear	0,91	0,91	0,99	0,61	0,68
56	MCV; MCH; MCHC	linear	0,81	0,84	0,95	0,43	0,45
57	Global; Hm; Hb; MCV	linear	0,94	0,92	0,98	0,74	0,73
58	Global; Hm; Hb; MCH	linear	0,91	0,90	0,94	0,74	0,69
59	Global; Hm; Hb; MCHC	linear	0,94	0,92	0,95	0,78	0,75
60	Global; Hm; MCV; MCH	linear	0,94	0,92	0,96	0,78	0,74
61	Global; Hm; MCV; MCHC	linear	0,94	0,92	0,96	0,78	0,77
62	Global; Hm; MCH; MCHC	linear	0,94	0,92	0,96	0,78	0,77
63	Global; Hb; MCV; MCH	linear	0,94	0,92	0,96	0,74	0,74
64	Global; Hb; MCV; MCHC	linear	0,94	0,92	0,96	0,74	0,74
65	Global; Hb; MCH; MCHC	linear	0,94	0,92	0,96	0,74	0,74
66	Global; MCV; MCH; MCHC	linear	0,84	0,86	0,95	0,52	0,53
67	Hm; Hb; MCV; MCH	linear	0,90	0,92	0,99	0,65	0,72
68	Hm; Hb; MCV; MCHC	linear	0,90	0,91	0,94	0,78	0,72
69	Hm; Hb; MCH; MCHC	linear	0,90	0,91	0,98	0,74	0,69
70	Hm; MCV; MCH; MCHC	linear	0,90	0,90	0,98	0,83	0,66
71	Hb; MCV; MCH; MCHC	linear	0,90	0,91	0,99	0,61	0,68
72	Global; Hm; Hb; MCV; MCH	linear	0,94	0,92	0,95	0,78	0,75
73	Global; Hm; Hb; MCV; MCHC	linear	0,94	0,91	0,95	0,78	0,71
74	Global; Hm; Hb; MCH; MCHC	linear	0,94	0,92	0,95	0,78	0,75
75	Global; Hm; MCV; MCH; MCHC	linear	0,94	0,91	0,96	0,70	0,70
76	Global; Hb; MCV; MCH; MCHC	linear	0,94	0,91	0,96	0,70	0,70
77	Hm; Hb; MCV; MCH; MCHC	linear	0,90	0,90	0,99	0,83	0,64
78	Global; Hm; Hb; MCV; MCH; MC	linear	0,94	0,91	0,96	0,70	0,70

A tabela acima apresenta a área sob a curva ROC, a máxima proporção de acertos, a sensibilidade e a especificidade no ponto de corte de máxima proporção de acertos (AGRESTI, 2002) e o coeficiente de concordância *kappa* (COHEN, 1960).

Um resultado interessante observado é que praticamente todos os índices com quatro ou mais variáveis obtiveram uma área sob a curva ROC maior ou igual a 0,90.

Isso, contudo, provavelmente é devido ao “super ajuste” do modelo com poucas observações e muitas variáveis. É esperado que estes modelos não obtenham resultados assim tão satisfatórios com o banco de validação. Isto porque todas as seis variáveis do hemograma são correlacionadas entre si, e nestes casos, em geral não é necessário trabalhar com todas as variáveis. Uma vez que uma já traz um pouco da informação da outra, basta trabalhar com algumas, que indiretamente refletirão todas.

De qualquer forma, escolheu-se dentre estes 78 índices os que possuíam as maiores áreas sob a curva ROC, e estes foram avaliados no banco de validação, juntamente com os outros índices descritos na literatura.

Outro resultado importante é que alguns índices com duas variáveis também apresentaram área sob a curva maior ou igual a 0,90. Foram eles: Global + Hb (linear e não-linear) e Hm+CHCM (linear e não-linear).

Os valores de área sob a curva ROC foram comparados estatisticamente. Como não são conhecidas as distribuições de probabilidade das variáveis estudadas, e para isto seria necessário comparar a distribuição de cada variável com alguma distribuição conhecida, o que demandaria bastante tempo e trabalho e sem garantia de resultados satisfatórios (descobrir a distribuição de probabilidades de cada uma das variáveis separadamente e de todas elas conjuntamente), resolveu-se utilizar reamostragem por *Bootstrap* (EFRON, 1979). Mas antes de descrever esta técnica, a metodologia clássica de testes de hipóteses (MAGALHÃES, 2011) será apresentada.

### **Teste de hipóteses e reamostragem *Bootstrap***

Para se testar estatisticamente uma hipótese (no caso em que um índice possui uma área sob a curva ROC maior que outro), é necessário primeiramente construir as hipóteses nula ( $H_0$ ) e alternativa ( $H_1$ ).

$H_0$ : as áreas sob a curva ROC dos dois índices são iguais, ou seja,  $A_1 = A_2 = A$ .

$H_1$ : as áreas sob a curva ROC dos dois índices são diferentes, ou seja,  $A_1 \neq A_2$ .

Para não haver confusão entre os verdadeiros valores das áreas  $A_1$  e  $A_2$  e suas estimativas (as áreas calculadas com a amostra), decidiu-se representar as estimativas com  $\tilde{A}_1$  e  $\tilde{A}_2$ .

Foi calculada, então, a probabilidade (valor-p) de se ter uma diferença tão grande ou maior que a observada na amostra, sob a hipótese nula. Por exemplo, no caso da comparação entre os índices 7 e 23 da tabela acima, em que o módulo da diferença das duas áreas foi  $|0,89 - 0,90| = 0,01$ , tem-se que :

$$\text{Valor-p} = \mathbb{P}_{A_1=A_2} (|\hat{A}_1 - \hat{A}_2| \geq 0,01)$$

Onde lê-se: o valor-p é a probabilidade, sob a hipótese nula de igualdade das áreas sob a curva ROC, de que ocorra em uma nova amostra uma diferença (em módulo) das áreas tão grande ou maior que a ocorrida na presente amostra.

Caso esta probabilidade seja muito pequena, foi decidido rejeitar a hipótese de igualdade das áreas na população. Tem-se, portanto, que escolher um critério para ser considerado quando esta probabilidade é pequena e quando esta não é pequena, e dá-se o nome do valor deste critério de nível de significância. Optou-se por escolher o valor usual de 0,05 para o nível de significância (MAGALHÃES, 2011).

A questão agora passa a ser como calcular esta probabilidade sob  $H_0$ . A área  $A$  ( $A = A_1 = A_2$ ) pode assumir qualquer valor entre 0 e 1 e, em tese, poder-se-ia escolher qualquer valor entre 0 e 1, uma vez que a hipótese nula não especificou qualquer um destes valores. Contudo, sabe-se que quanto mais próximo este valor  $A$  for das estimativas encontradas  $\hat{A}_1$  e  $\hat{A}_2$ , mais próximo da realidade será o resultado. Por exemplo, no caso dos índices 7 e 23, onde  $\hat{A}_1 = 0,89$  e  $\hat{A}_2 = 0,90$ , não é uma boa escolha para  $H_0$  o valor  $A=0,10$ . Se assim for feito, apesar de se conseguir calcular a probabilidade de que (o módulo da) a diferença das áreas seja maior ou igual a 0,01, esta probabilidade não será condizente com os valores observados na amostra, mais próximos de 0,90 que de 0,10. Resolveu-se, portanto, escolher para  $H_0$  algum valor de  $A$  tal que  $\hat{A}_1 \leq A \leq \hat{A}_2$ , nos casos em que  $\hat{A}_1 \leq \hat{A}_2$ , e  $\hat{A}_2 \leq A \leq \hat{A}_1$ , nos casos em que  $\hat{A}_2 \leq \hat{A}_1$ . No exemplo dos índices 7 e 23, escolher-se-ia para  $A$  algum valor entre 0,89 e 0,90.

Entretanto, mesmo tendo escolhido o valor para as áreas na hipótese nula, ainda não é possível analiticamente calcular a probabilidade de que a diferença (em módulo) entre as áreas na amostra seja maior ou igual a 0,01, pois não são conhecidas as

distribuições de probabilidade dos índices. Para resolver este problema, foi utilizada a técnica de simulação por reamostragem denominada *Bootstrap*.

No *Bootstrap*, a seleção da reamostra é sempre feita selecionando aleatoriamente os indivíduos (amostragem com reposição, ou seja, o mesmo indivíduo pode ser escolhido mais de uma vez), e não os valores dos índices separadamente (EFRON, 1979). Assim, por exemplo, se estiverem sendo comparados os índices 7 e 23, e determinado indivíduo da amostra possui os valores 10,1 e 35,0 em cada índice, e sempre que este for escolhido, os valores dos dois índices na reamostra serão também 10,1 e 35,0, ou seja, um valor não pode ser selecionado e o outro não. A reamostragem tem que ser feita desta forma para que a correlação esperada entre os índices na reamostra seja a mesma da correlação na amostra, assim como a distribuição esperada de cada índice separadamente na reamostra também seja a mesma da amostra. Desta forma, com as distribuições univariadas e correlações esperadas da reamostra sendo iguais às da amostra, tem-se que a distribuição bivariada esperada da reamostra também é a mesma da distribuição bivariada da amostra.

A simulação foi dividida em duas principais etapas. A primeira etapa é a simulação para encontrar uma reamostra sob  $H_0$ , ou seja, em que as áreas das curvas ROC dos índices da reamostra são iguais e estão entre os valores das áreas dos índices na amostra original. Esta reamostra será considerada como a população da segunda etapa, que consiste em reamostrar a partir desta população sob  $H_0$  e calcular o valor-p do teste de hipóteses descrito anteriormente. Abaixo foram detalhadas as duas etapas.

### Primeira etapa

- 1) Foi simulado  $n$  (onde  $n$  é exatamente o tamanho da amostra original) indivíduos por reamostragem com reposição, conforme descrito no parágrafo anterior, a partir da amostra original;
- 2) Calculou-se a área da curva ROC dos dois índices da reamostra bem como a diferença entre estas;
- 3) Foi avaliado se as áreas sob a curva ROC dos dois índices são iguais e se estas áreas estão dentro do intervalo entre  $\tilde{A}_1$  e  $\tilde{A}_2$ ;

- 4) Se pelo menos uma das comparações do item 3 for falsa, retorna-se ao passo 1, até que no passo 3 ambas as comparações sejam verdadeiras;
- 5) A reamostra final, então, pode ser usada como uma população sob  $H_0$  na segunda etapa.

### Segunda etapa

- 1) Realizou-se a etapa 1  $m_1$  vezes e registrou-se as  $m_1$  populações sob  $H_0$  encontradas.
- 2) Foi escolhida (sem reposição) uma destas  $m_1$  populações e simulou-se a partir desta  $n$  indivíduos por reamostragem com reposição (cada indivíduo possui valores para os dois índices);
- 3) Calculou-se a área da curva ROC dos dois índices da reamostra bem como a diferença entre elas;
- 4) Foi avaliado se o módulo da diferença entre as áreas sob a curva ROC dos índices reamostrados é maior ou igual a  $|\hat{A}_1 - \hat{A}_2|$ , e registrou-se o resultado na forma dicotômica, ou seja, verdadeiro ou falso;
- 5) O processo foi repetido a partir do passo 2  $m_2$  vezes para cada uma das  $m_1$  populações sob  $H_0$  encontradas no passo 1;
- 6) Ao final das  $m_1 m_2$  simulações, foram somados todos os resultados do tipo “verdadeiro” encontrados, e estes foram divididos por  $m_1 m_2$ . Este valor é uma estimativa por *Bootstrap* do valor-p do teste de hipóteses da comparação entre as áreas sob a curva ROC dos dois índices;

Foi escolhido o índice que obteve o maior valor de área sob a curva ROC como índice de referência. Na verdade, como vários índices ficaram “empatados” no primeiro lugar com área de 0,94, foi escolhido aleatoriamente o índice 63, que é função das variáveis Global, Hb, VCM e HCM:

$$I_{63} = -0,214 * Global - 1,293 * Hb + 0,536 * MCV - 0,643 * MCH$$

### **Resultados do *Bootstrap***

Através da simulação por reamostragem *Bootstrap*, foi observado que 40 índices foram considerados iguais ao índice 63, no que diz respeito à área sob a curva ROC. Foram eles: 8, 9, 10, 17, 21, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 49, 50, 51, 53, 54, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 67, 69, 71, 72, 73, 74, 75, 76 e 78.

Decidiu-se, então, partir para o banco de validação, que conta com informações de 185 pacientes, e comparar estes 40 índices com os índices escolhidos na literatura:

ID	Variáveis	Modelo	área sob a curva ROC	máxima proporção de acertos	sensibilidade (máxima prop. de acertos)	especificidade (máxima prop. de acertos)	kappa (máxima prop. de acertos)
GK	Hb; RDW; MCV	não-linear	0,957	0,946	0,994	0,733	0,777
SL	MCH; MCV	não-linear	0,784	0,838	1,000	0,000	NA
Srivastava	Hm; MCH	não-linear	0,888	0,876	0,968	0,533	0,446
RDWI	Hm; MCV; RDW	não-linear	0,969	0,962	1,000	0,800	0,846
IE	Hm; MCV	linear	0,906	0,897	0,974	0,567	0,556
IS	Hm; Hb; MCV; MCH	linear	0,931	0,919	1,000	0,567	0,626
IR	Hm; RDW	não-linear	0,960	0,962	0,994	0,800	0,851
MI	Hm; MCV	não-linear	0,916	0,897	0,974	0,567	0,556
8	Global; Hm	não-linear	0,932	0,914	0,981	0,800	0,632
9	Global; Hb	linear	0,793	0,865	1,000	0,167	0,251
10	Global; Hb	não-linear	0,780	0,859	0,987	0,367	0,266
17	Hm; Hb	linear	0,948	0,930	0,961	0,767	0,738
21	Hm; MCH	linear	0,946	0,919	1,000	0,700	0,626
23	Hm; MCHC	linear	0,950	0,957	0,994	0,800	0,827
24	Hm; MCHC	não-linear	0,937	0,957	0,994	0,767	0,827
25	Hb; MCV	linear	0,954	0,951	0,994	0,733	0,802
26	Hb; MCV	não-linear	0,949	0,946	0,994	0,733	0,777
27	Hb; MCH	linear	0,944	0,919	0,942	0,800	0,713
29	Hb; MCHC	linear	0,803	0,876	0,968	0,400	0,446
37	Global; Hm; Hb	linear	0,927	0,919	0,987	0,567	0,650
39	Global; Hm; MCH	linear	0,923	0,919	0,987	0,567	0,650
40	Global; Hm; MCHC	linear	0,939	0,951	0,987	0,767	0,808
41	Global; Hb; MCV	linear	0,942	0,941	0,974	0,767	0,772
42	Global; Hb; MCH	linear	0,919	0,908	0,974	0,600	0,615
43	Global; Hb; MCHC	linear	0,797	0,865	1,000	0,167	0,251
49	Hm; Hb; MCHC	linear	0,946	0,941	0,994	0,700	0,751
50	Hm; MCV; MCH	linear	0,945	0,941	0,994	0,700	0,751
51	Hm; MCV; MCHC	linear	0,947	0,946	0,987	0,733	0,784
53	Hb; MCV; MCH	linear	0,946	0,941	0,994	0,700	0,751
54	Hb; MCV; MCHC	linear	0,946	0,941	0,987	0,767	0,758
57	Global; Hm; Hb; MCV	linear	0,936	0,935	0,981	0,700	0,740
58	Global; Hm; Hb; MCH	linear	0,919	0,919	0,981	0,600	0,661
59	Global; Hm; Hb; MCHC	linear	0,933	0,935	0,974	0,733	0,748
60	Global; Hm; MCV; MCH	linear	0,934	0,930	0,974	0,733	0,723
61	Global; Hm; MCV; MCHC	linear	0,935	0,935	0,974	0,733	0,748
62	Global; Hm; MCH; MCHC	linear	0,935	0,935	0,974	0,733	0,748
63	Global; Hb; MCV; MCH	linear	0,934	0,930	0,974	0,733	0,723
64	Global; Hb; MCV; MCHC	linear	0,934	0,930	0,974	0,733	0,723
65	Global; Hb; MCH; MCHC	linear	0,937	0,935	0,981	0,733	0,740
67	Hm; Hb; MCV; MCH	linear	0,943	0,941	0,994	0,667	0,751
69	Hm; Hb; MCH; MCHC	linear	0,946	0,941	0,994	0,700	0,751
71	Hb; MCV; MCH; MCHC	linear	0,945	0,935	0,994	0,700	0,724
72	Global; Hm; Hb; MCV; MCH	linear	0,932	0,930	0,968	0,733	0,731
73	Global; Hm; Hb; MCV; MCHC	linear	0,934	0,935	0,974	0,733	0,748
74	Global; Hm; Hb; MCH; MCHC	linear	0,933	0,935	0,974	0,733	0,748
75	Global; Hm; MCV; MCH; MCHC	linear	0,932	0,930	0,987	0,733	0,706
76	Global; Hb; MCV; MCH; MCHC	linear	0,933	0,930	0,981	0,733	0,715
78	MC	linear	0,929	0,930	0,968	0,733	0,731

É fácil observar que o índice RDWI obteve a maior área sob a curva ROC, de 0,969. Logo, este foi escolhido como índice de referência para comparação através de reamostragem *Bootstrap*, da mesma forma que foi realizado com o primeiro banco de dados.

Abaixo foram apresentados os únicos índices em que não foi possível rejeitar a hipótese de igualdade das áreas sob a curva ROC com o índice RDWI. Sobraram apenas dois dos índices da literatura e 5 dos novos índices desenvolvidos, que foram considerados equivalentes ao RDWI, no que diz respeito à área sob a curva ROC.

Primeiramente ressalta-se que todos os índices restantes da literatura utilizam a variável RDW, que não é uma variável presente no hemograma dos contadores mais simples. Logo, caso um novo índice que não utiliza esta variável obtenha um resultado semelhante a estes, este novo índice será preferido.

Utilizou-se também a mesma metodologia de reamostragem *Bootstrap* que foi utilizada para comparar a área sob a curva ROC também para comparação da proporção máxima de acerto dos índices, além do coeficiente de concordância *kappa* no ponto de corte de máxima proporção de acertos dos índices. As únicas diferenças no método é que reamostrou-se até encontrar  $m_1$  populações em que a proporção máxima de acertos é igual nos dois índices na etapa 1, ou seja, mudou-se as palavras “área sob a curva ROC” por “máxima proporção de acertos” (“coeficiente de *kappa* no ponto de corte de máxima proporção de acertos” no caso de comparar o *kappa*) nos passos 2 e 3 da etapa 1. Da mesma forma, também foi mudado nos passos 3, 4 e 6 da etapa 2 o termo “área sob a curva ROC” por “máxima proporção de acertos” (“coeficiente de *kappa* no ponto de corte de máxima proporção de acertos” no caso de comparar o *kappa*), bem como o valor das estimativas das áreas sob a curva ROC  $\hat{A}_1$  e  $\hat{A}_2$  pelas estimativas das máximas proporções de acertos  $\hat{p}_{max.1}$  e  $\hat{p}_{max.2}$  ( $\hat{k}_{p.max.1}$  e  $\hat{k}_{1(p.max.2)}$ ). Assim, todos estes oito índices foram considerados semelhantes na comparação da máxima proporção de acertos e somente os índices IR, 23 (Hm; CHCM) e 25 (Hb; VCM) foram considerados semelhantes ao RDWI quando comparado o coeficiente de concordância *kappa* no ponto de corte de máxima proporção de acertos. Por último, também foram comparados os índices no ponto de corte que dá 95% de sensibilidade para a anemia ferropriva. Isso porque decidiu-se que um bom índice para

a discriminação da anemia ferropriva e da talassemia deve ter uma maior sensibilidade em diagnosticar a anemia ferropriva, uma vez que dentre os dois erros possíveis e suas consequências, que são:

- 1) o paciente possuir anemia ferropriva e ser diagnosticado como talassêmico e receber durante um mês o tratamento específico para talassemia;
- 2) o paciente possuir talassemia e ser diagnosticado como portador de anemia ferropriva e receber durante um mês o tratamento à base de ferro;

foi decidido que o primeiro erro possui consequências mais graves que o segundo.

Assim, comparou-se a proporção de acertos dos sete índices que sobraram nos pontos de corte onde a sensibilidade é alta, de 95%, com o índice RDWI (também no ponto de corte onde a sensibilidade é de 95%). Novamente utilizando a reamostragem *Bootstrap*, somente os índices 23 (Hm; CHCM) e 25 (Hb; VCM) foram considerados semelhantes aos índices da literatura, que utilizam o RDW na sua equação.

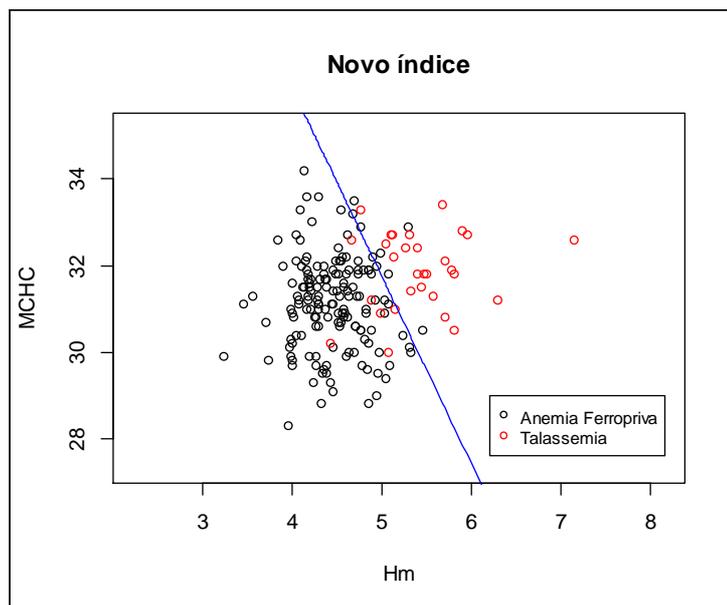
Decidiu-se escolher, portanto, os índices 23 e 25 como melhores índices lineares que utilizam as seis variáveis do hemograma comum para predizer o tipo de anemia do paciente (anemia ferropriva ou talassemia). Os índices são:

$$I_{23} = 3,16 * Hm + 0,73 * MCHC$$

$$I_{25} = 1,34 * Hb - 0,27 * MCV$$

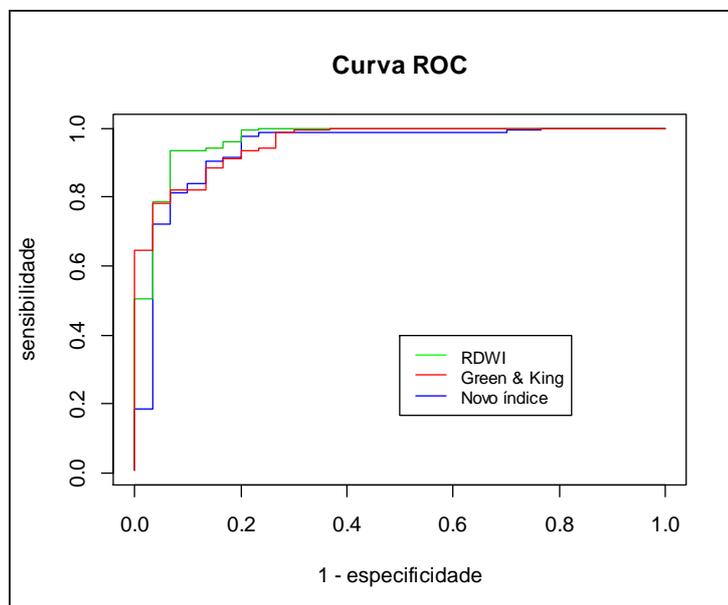
Onde os pontos de corte do índice 23 para maior proporção de acertos e para sensibilidade de 95% são 43,52 e 42,99. Já os pontos de corte do índice 25 para maior proporção de acertos e para sensibilidade de 95% são 8,95 e 8,98.

Abaixo foi apresentado o gráfico com a reta de discriminação do  $I_{23}$ , chamando-o de Novo Índice.



**Figura 10** - Valores de Hemácia e CHCM dos pacientes do banco de dados com 185 pacientes, de acordo com o tipo de anemia, bem como a reta de discriminação do Novo Índice.

Abaixo também foi apresentada a curva ROC dos índices 23 (Novo Índice), RDWI e de Green & King.



**Figura 11** - Curva ROC do índice RDWI, do Índice de Green & King e do Novo Índice.

### Poder da amostra em detectar diferenças entre as áreas sob a curva ROC

As duas etapas da simulação *Bootstrap* foram aproveitadas para estimar o poder da amostra (MAGALHÃES, 2011) em captar diferenças entre as áreas sob a curva ROC. Ou seja, na primeira etapa, no lugar de simular até encontrar uma população com áreas iguais, foi simulado apenas uma vez, e registrou-se a diferença entre as áreas sob as curvas ROC. Realizou-se, então, a segunda etapa considerando que a reamostra da etapa 1 é a população, fazendo  $m_2$  repetições, e contando qual o percentual de vezes destas  $m_2$  repetições em que a hipótese nula seria rejeitada<sup>1</sup>. Este percentual é a estimativa do poder desta amostra de 185 pacientes em detectar uma diferença de áreas sob as curvas maior ou igual à encontrada pela simulação na etapa 1, ou seja, da população com a qual foi realizada a etapa 2. Então, as etapas 1 e 2  $m_1$  vezes foram repetidas e, no final, ter-se-á  $m_1$  estimativas do poder da amostra para  $m_1$  diferenças entre as áreas sob as curvas ROC.

Enfim, o resultado encontrado é que caso o módulo da diferença entre as áreas seja de pelo menos 0,03, o poder da amostra (com a técnica de *Bootstrap*) em detectar esta diferença (rejeitar a hipótese nula) é de 80%. O valor de 80% é o valor usualmente escolhido para cálculos de poder de amostra (LEMESHOW, 1990).

Concluí-se, desta forma, que embora não haja evidências estatísticas, com a amostra coletada, de que as áreas sob as curvas ROC dos índices RDWI e o índice 23 ( $3,16 * Hm + 0,73 * MCHC$ ) sejam diferentes, esta amostra de 185 pacientes só tem poder de detectar diferenças de áreas iguais ou superiores a 0,03. Assim, a diferença entre as verdadeiras áreas dos índices pode variar de 0 a 0,03.

---

<sup>1</sup> Foi considerado que a hipótese nula seria rejeitada toda vez que a diferença entre as áreas das curvas ROC da simulação fossem maior que o percentil 97,5 ou menor que o percentil 2,5 das diferenças das áreas segundo as simulações sob a hipótese nula (em que a reamostragem é feita com a população com áreas iguais). No caso da comparação entre o índice 23 e o RDWI, estes percentis 2,5 e 97,5 foram -0.02 e +0.02.

## Bibliografia

AGRESTI, A. (2002). *Categorical Data Analysis* (2ª ed.). New York: Wiley Series in Probability and Statistics.

COHEN, J. (1960). A coefficient of agreement for nominal scales. *Educational and Psychological Measurement*, pp. 37-46.

EFRON, B. (1979). Bootstrap Methods: Another Look at the Jackknife. *The Annals of Statistics*, 7(1), pp. 1-26.

FISHER, R. A. (1936). The Use of Multiple Measurements in Taxonomic Problems. *Annals of Eugenics*, pp. 179-188.

LEMESHOW, S. H. (1990). *Adequacy of Sample Size in Health Studies*. Chichester: John Wiley & Sons.

MAGALHÃES, M. N. (2011). *Noções de Probabilidade e Estatística*. São Paulo: EDUSP.

MINGOTI, S. A. (2005). *Análise de Dados Através de Estatística Multivariada*. Belo Horizonte: Editora UFMG.

SHAPIRO, S. S. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, pp. 591-611.

ZOU, K. H. (2007). Receiver-Operating Characteristic Analysis for Evaluating Diagnostic Tests and Predictive Models. *Circulation*, pp. 654-657.

**ANEXO B - Parecer COEP - UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Parecer nº. ETIC 344/09**

**Interessado(a): Profa. Maria das Graças Carvalho**  
**Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas**  
**Faculdade de Farmácia - UFMG**

---

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 29 de setembro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Aspectos laboratoriais das talassemias menores**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. T. Marques Amaral', is written over a horizontal line.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
**Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO C - Parecer Hospital das Clínicas - UFMG**

**Universidade Federal de Minas Gerais**  
**Hospital das Clínicas**  
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

**UFMG**

Belo Horizonte, 14 de outubro de 2009.

**PROCESSO: Nº 114/09**

**TÍTULO: "ASPECTOS LABORATORIAIS DAS TALASSEMIAS MENORES"**

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 29/09/2009, esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional. Solicitamos enviar à DEPE **relatório** parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

PROF. HENRIQUE VITOR LEITE  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

A Sr<sup>a</sup>.  
Prof<sup>a</sup>. Maria das Graças Carvalho  
Dpto. Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia/UFMG

## ANEXO D - Parecer Hospital Governador Israel Pinheiro - IPSEMG



PARECER CONSUBSTANCIADO Nº. 129/09 CEP/HGIP/IPSEMG

CAAE – 0018.0.191.203-09

**Registro CEP: 361/09** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a esta pesquisa).

**Projeto de Pesquisa:** "Aspectos laboratoriais das talassemias menores"

**Grupo:** III

**Área Temática:** Não se aplica

**Patrocinador:** Não se aplica

**Pesquisador (a) Principal:** Januária Fonseca Matos

**Instituição:** IPSEMG – Laboratório de Patologia Clínica do IPSEMG

**Data de entrada:** agosto/2009

Em reunião dia 03/09/2009, foram solicitadas alterações do projeto de pesquisa supracitado e as pendências foram atendidas conforme **Res. CNS/MS 196/96**.

**Documentação** - Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos  
Orçamento (referente à análise molecular e eletroforese de hemoglobina  
Projeto (Introdução, Justificativa, Objetivos, Material e Métodos, Referências)  
Solicitação de dispensa do TCLE  
Declaração de cumprimento da Res. CNS 196/96  
Termo de Compromisso do IPSEMG

**Objetivos** - Avaliar as talassemias menores, enfocando a  $\alpha$ -talassemia, através de métodos hematológicos convencionais e métodos moleculares de diagnóstico no estado de Minas Gerais.

**Critérios de inclusão** - Grupo 1 (pacientes provenientes do ambulatório do Hospital das Clínicas)

- VCM menor que 80 fL
- Características clínicas de  $\alpha$ -talassemia

Grupo 2 (pacientes provenientes do laboratório de Patologia Clínica do HGIP)

- Pacientes com idade superior a 18 anos
- VCM menor que 80 fL
- Mulheres com hemoglobina menor que 12 g/dL e ferritina menor que 6 ng/mL
- Homens com hemoglobina menor que 13 g/dL e ferritina menor que 28 ng/mL

**Critérios de exclusão** - Pacientes portadores de doenças malignas e inflamatórias / infecciosas.

**Tamanho da amostra** - 230 pacientes, sendo 30 provenientes do Ambulatório de Hematologia do Hospital das Clínicas e 200 provenientes do laboratório de Patologia Clínica do HGIP/IPSEMG

**Duração do Estudo** - 18 meses

**Resumo do Estudo** - O estudo pretende avaliar as talassemias menores, enfocando a  $\alpha$ -talassemia, através da caracterização molecular das principais mutações genéticas envolvidas nesta patologia; determinar o grau de concordância entre os métodos convencionais e métodos moleculares para o diagnóstico da  $\alpha$ -talassemia; correlacionar as alterações genéticas com as alterações hematológicas detectadas no hemograma e contagem de reticulócitos na  $\alpha$ -talassemia; determinar a eficiência do Novo Índice (NI) para a confirmação do diagnóstico de  $\alpha$ - e  $\beta$ -talassemia do tipo menor.



O estudo fará uma análise em 2 grupos de pacientes, um grupo (n=30 pacientes) com características clínicas e laboratoriais sugestivas de  $\alpha$ -talassemia e outro (n=200 pacientes) com características de anemia ferropriva, excluída a possibilidade do indivíduo apresentar também  $\alpha$ -talassemia.

Estão previstos os seguintes exames:

Grupo 1: coleta de 5 mL de sangue total em EDTA, confecção de filme sanguíneo (hemograma?), estudo genético (extração de DNA, PCR), eletroforese de hemoglobina, dosagem de HbA2 e HbF após eluição da fita eletroforética. Destes pacientes, serão obtidos dados de prontuários, como dosagem de ferritina, eletroforese de hemoglobina, contagem de reticulócitos, pesquisa de HbH e hemograma.

Grupo 2: coleta de dados do hemograma já confeccionado (Hb, VCM), ferritina (não está claro se apenas serão coletados dados já existentes para este exame), utilização de "sobras" de sangue para análise molecular (extração de DNA, PCR).

Embora estejam citados os métodos a serem utilizados, não há um detalhamento a respeito da metodologia referente a cada um deles.

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** - Solicita dispensa de obtenção do TCLE, apresentando os seguintes argumentos:

- Serão utilizados resultados de exames previamente solicitados pelos médicos e "sobras" de amostras de sangue já coletadas dos pacientes, sem necessidade de coletas adicionais.
- A obtenção do TCLE de cada indivíduo que se dirija ao Serviço com solicitação médica para a realização do hemograma perturbaria o andamento das atividades do serviço, em função do grande número de pacientes atendidos diariamente.

**Conclusão:** Diante do exposto e levando-se em conta que os relatórios sobre o andamento de projetos anteriores encontram-se atualizados, o Comitê de Ética em Pesquisa – IPSEMG, de acordo com a Resolução/CNS/MS 196/96, manifesta-se pela **aprovação do projeto acima citado**.

**Situação:** Pesquisa aprovada.

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2009.

Magali de Oliveira Lima  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital Governador Israel Pinheiro- HGIP.

## APÊNDICE A - Ficha clínica



### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS FACULDADE DE FARMÁCIA

#### “Aspectos laboratoriais das talassemias menores”

#### Ficha Clínica:

1) Nome: \_\_\_\_\_

2) Endereço: Rua (Av): \_\_\_\_\_

nº: \_\_\_\_\_ compl: \_\_\_\_\_ Bairro \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ UF \_\_\_\_\_

Telefone Fixo: \_\_\_\_\_ Celular: \_\_\_\_\_

email: \_\_\_\_\_

3) Data de nascimento: \_\_\_\_\_

4) Sexo: 1 ( ) masculino    2 ( ) feminino

5) Faz uso de medicamentos contínuos?

1 ( ) sim    2 ( ) não    0 ( ) Não sabe    9 ( ) Não respondeu

5.1) Em caso afirmativo, qual medicamento?

\_\_\_\_\_

5.2) Desde quando? \_\_\_\_\_

5.3) Outros medicamentos: \_\_\_\_\_

6) Há quanto tempo você sabe que tem anemia? \_\_\_\_\_

7) Você tem o diagnóstico de alguma doença crônica?

1 ( ) sim    2 ( ) não    0 ( ) Não sabe    9 ( ) Não respondeu

7.1) Qual? \_\_\_\_\_

## 8) Resultados de exames laboratoriais:

8.1) Contagem de reticulócitos: \_\_\_\_\_

8.2) Pesquisa de HbH: \_\_\_\_\_

8.3) Eletroforese de Hemoglobina: \_\_\_\_\_

8.4) Dosagem de HbA<sub>2</sub>: \_\_\_\_\_

8.5) Dosagem de HbF: \_\_\_\_\_

8.6) Ferritina sérica: \_\_\_\_\_

8.7) Hemograma: \_\_\_\_\_

Hm: \_\_\_\_\_

Hb: \_\_\_\_\_

Ht: \_\_\_\_\_

VCM: \_\_\_\_\_

HCM: \_\_\_\_\_

CHCM: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido****CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Instituições:

Hospital das Clínicas/UFMG

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas – Faculdade de Farmácia – UFMG

Título do Projeto:

Aspectos laboratoriais das talassemias menores

---

**DESCRIÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa desenvolvida pelo Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Este estudo tem por objetivo a avaliação de indivíduos normais e possíveis portadores de talassemia através de métodos hematológicos convencionais e métodos moleculares de diagnóstico no estado de Minas Gerais.

Não existe risco algum para você. Será necessária apenas uma amostra de 5 mL de sangue venoso. Na coleta poderá haver a formação de um hematoma (mancha roxa) no local onde a agulha foi introduzida.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e mantidas em poder da pesquisadora principal e dos profissionais envolvidos com o projeto de pesquisa, sendo que você terá acesso a estas sempre que desejar.

Se você tiver quaisquer dúvidas sobre este estudo, poderá entrar em contato a qualquer momento com Profa. Maria das Graças Carvalho no telefone (31) 3409-6900 ou com Januária Fonseca Matos no telefone (31) 3327-0783.

Você tem o direito de ligar para o Comitê de Ética do Hospital das Clínicas, para esclarecimento de dúvidas sobre seus direitos como participante e sobre o aspecto ético deste estudo. Endereço: Avenida Professor Alfredo Balena, 110; Bairro Santa Efigênia. Telefone: 3409-9379. Belo Horizonte, MG.

Você tem que saber que sua participação no projeto é voluntária e que você tem a liberdade de não querer fazer parte da pesquisa e caso deseje pode sair quando quiser. Você não terá qualquer prejuízo se não participar deste estudo.

---

Assinatura do pesquisador

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

---

Assinatura do sujeito da pesquisa ou  
representante legal

## APÊNDICE C - Protocolo para extração de DNA

### EXTRAÇÃO DE DNA A PARTIR DE SANGUE TOTAL COLHIDO EM EDTA

A um tubo tipo *ependorf* de 1,5 mL adicionar 900  $\mu$ L de solução de lise de hemácias e 300  $\mu$ L de sangue total em EDTA e incubar por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a lise das hemácias centrifugar a mistura por três minutos a 14000 rpm à temperatura ambiente em microcentrífuga SIGMA. Desprezar o sobrenadante e solubilizar o pellet com 300  $\mu$ L de solução de lise de leucócitos e homogeneizar. Ainda nesta etapa, adicionar 150  $\mu$ L de solução de precipitação de proteínas, misturar no vórtex por 20 a 30 segundos e centrifugar a 14000 rpm por três minutos. Transferir o sobrenadante para outro tubo *ependorf* contendo 300  $\mu$ L de isopropanol e homogeneizar para que ocorra precipitação do DNA. Em seguida, centrifugar essa solução a 1400 rpm por três minutos, e descartar o sobrenadante. Posteriormente, adicionar 300  $\mu$ L de etanol a 70% e ressuspender o *pellet* com batidas no tubo. Centrifugar novamente a mistura a 14000 rpm por três minutos e descartar o sobrenadante. Finalmente, adicionar 25  $\mu$ L de solução de hidratação.

## APÊNDICE D - Protocolo para pesquisa das mutações deletionais

### PREPARO DO PCR PARA UMA AMOSTRA

Mix	Volume
Master Mix	30 $\mu$ L
Lis R	1,5 $\mu$ L
Lis F	1,5 $\mu$ L
SEA R	1,0 $\mu$ L
SEA F	1,0 $\mu$ L
FIL R	1,0 $\mu$ L
FIL F	1,0 $\mu$ L
THAI R	1,0 $\mu$ L
THAI F	1,0 $\mu$ L
$\alpha_2$ R	1,3 $\mu$ L
$\alpha_2$ 3.7 F	1,3 $\mu$ L
Q Solution	6,0 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O RNA <i>free</i>	1,7 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>49,3 <math>\mu</math>L</b>
<b>DNA</b>	<b>0,7 <math>\mu</math>L</b>

Mix	Volume
Master Mix	30,00 $\mu$ L
Lis R	1,5 $\mu$ L
Lis F	1,5 $\mu$ L
4.2 R	1,0 $\mu$ L
4.2 F	1,0 $\mu$ L
MED R	1,0 $\mu$ L
MED F	1,0 $\mu$ L
$\alpha_2$ R	1,3 $\mu$ L
$\alpha_2$ 3.7 F	1,7 $\mu$ L
3.7 20.5 R	1,0 $\mu$ L
20.5 F	1,0 $\mu$ L
Q Solution	6,0 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O RNA <i>free</i>	1,3 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>49,3 <math>\mu</math>L</b>
<b>DNA</b>	<b>0,7 <math>\mu</math>L</b>

**APÊNDICE E - Protocolo para pesquisa da mutação não deletional HphI****PREPARO DO PCR PARA UMA AMOSTRA**

MIX	Volume
Master Mix	12,5 $\mu$ L
NCO Hph anti R	2,0 $\mu$ L
Hph F	2,0 $\mu$ L
Q Solution	2,5 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O RNA free	5,0 $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>24,0 <math>\mu</math>L</b>
<b>DNA</b>	<b>1,0 <math>\mu</math>L</b>

**DIGESTÃO ENZIMÁTICA PARA UMA AMOSTRA**

MIX	Volume
H <sub>2</sub> O	7,7 $\mu$ L
Tampão	1,5 $\mu$ L
<i>HphI</i>	0,5 $\mu$ L

**APÊNDICE F - Artigo aceito para publicação****Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**Rua Dois de Dezembro, 78/909 Catete  
Rio de Janeiro RJ Brasil  
CE P 22220-040**Rio de Janeiro, terça-feira, 24 de abril de 2012****Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) Januária Fonseca Matos**Referente ao código de fluxo: **743**  
Classificação: **Comunicação Breve**

Temos o prazer de informar que o manuscrito **O hemograma nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais** foi aprovado pelo Conselho Editorial do Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial e será publicado em breve. Lembramos que algumas modificações poderão ser solicitadas até a publicação do artigo.

Obrigado por submeter seu trabalho à Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.

Atenciosamente,

**Adagmar Andriolo**  
Editor**SILVANA MARIA ELOI SANTOS - Patologia Clínica (Medicina Laboratorial)**  
Editor**« « « Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP » » »**

Esta é um versão gerada unicamente para visualização dentro do SGP.  
 A versão a ser impressa utilizará outros padrões de formatação.  
 This is a version generated only for visualization inside of SGP.  
 The version to be printed will use other formatting patterns.

### Comunicação Breve

**Código de Fluxo: 743**

## O hemograma nas anemias microcíticas e hipocrômicas: aspectos diferenciais

### Blood tests in microcytic and hypochromic anemias: differential aspects

#### Autores (Authors)

**Januária Fonseca Matos:** Mestrado - Professora do Instituto Federal Minas Gerais Campus Ouro Preto

**Luci Maria Sant'Ana Dusse:** Doutorado - Professora da Faculdade de Farmácia da UFMG

**Karina Braga Gomes:** Doutorado - Professora da Faculdade de Farmácia da UFMG

**Rachel Versiani Bressane Stubert:** Graduação - Farmacêutica Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Governador Israel Pinheiro (IPSEMG)

**Mônica de F. Ribeiro Ferreira:** Mestrado - Farmacêutica Bioquímica do Serviço de Patologia Clínica do Hospital Israel Pinheiro (IPSEMG)

**Roberta Coeli Neves Moreira:** Graduação - Estagiária

**Ana Paula Salles Moura Fernandes:** Doutorado - Professora da Faculdade de Farmácia da UFMG

**José Roberto de Faria:** Doutorado - Professor da Faculdade de Medicina da UFMG

**Maria das Graças Carvalho:** Doutorado - Professora da Faculdade de Farmácia da UFMG

#### Descritores (Palavras-chave)

Anemia microcítica, Talassemia, Anemia ferropriva

#### Keywords

Microcytic anemia, Thalassemia, Iron deficiency anemia

#### Resumo

O diagnóstico diferencial das anemias microcíticas é clinicamente importante. Na tentativa de tornar este diagnóstico menos oneroso e mais eficiente, o uso de parâmetros dos contadores automáticos tem sido sugerido. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficiência diagnóstica de alguns parâmetros do hemograma na diferenciação das anemias microcíticas. Foram comparados os parâmetros hematológicos de 395 pacientes portadores de anemia ferropriva, anemia de doença crônica ou talassemia menor. O número de hemácias apresentou os maiores valores combinados de sensibilidade e especificidade na diferenciação destas anemias. Em conclusão, a contagem de hemácias, pode ser útil no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas.

#### Abstract

Differential diagnosis of microcytic anemia is clinically important. In an attempt to make this diagnosis less costly and more efficient, the use of some parameters obtained from automated blood count analyzers has been suggested. The objective of this study was to evaluate the efficiency of parameters of blood count in differentiating microcytic anemias. Blood parameters were compared in 395 patients with iron deficiency anemia, anemia of chronic disease or thalassemia trait. The number of red blood cells showed the highest combined sensitivity and specificity in differentiating these anemias. In conclusion, blood counts, may be useful in differential diagnosis of microcytic anemias.

Trabalho submetido em (Article's submission in): 19/11/2011 09:19:39

Instituição (Affiliation):

Correspondência (Correspondence): Correspondência: Maria das Graças Carvalho Laboratório de Hematologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha 31270-010 - Belo Horizonte (MG), Brasil Tel: (55 31) 3409-6881; Fax: (55 31) 3409-6895 E-mail: mgcarvalho@farmacia.ufmg.br

Suporte Financeiro (Financial support):

Submetido para (Submitted for): Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 743

## Introdução

O diagnóstico diferencial das anemias microcíticas e hipocrômicas (AMH) é clinicamente importante, uma vez que apresentam causas, tratamento e prognóstico diferentes. Atualmente, a comprovação diagnóstica de tais doenças é obtida pela realização de exames que avaliam o metabolismo do ferro, a eletroforese de hemoglobina e dosagem de HbA<sub>2</sub>. Em determinadas condições de concomitância de doenças como anemia ferropriva (AF) e anemia de doença crônica (ADC), os resultados dos exames padrão-ouro podem sofrer interferência da doença intercorrente, dificultando o diagnóstico.

Com o intuito de abreviar custos e aperfeiçoar o diagnóstico destas anemias, vários parâmetros hematológicos têm sido sugeridos<sup>(1,2)</sup>. Entre estes, podem ser citados o volume corpuscular médio (VCM), o número de hemácias, dentre outros da série vermelha. Além destes, também o número de plaquetas poderia auxiliar na distinção das anemias microcíticas visto que muitas condições clínicas podem cursar com trombocitose reativa, entre elas a AF e doenças inflamatórias<sup>(3,4)</sup>.

Este trabalho tem como objetivo discutir a eficiência de alguns parâmetros do tradicional hemograma no diagnóstico diferencial das AMH.

## Material e Métodos

Foram coletadas amostras de 289 pacientes atendidos no Serviço de Patologia Clínica do IPSEMG, Belo Horizonte, com idade > 18 anos, hemoglobina < 12,0 g/dL (mulheres) e 13,0 g/dL (homens) e VCM < 80 fL, caracterizando um quadro de AMH. A avaliação hematológica foi realizada no contador Advia 120 (Bayer). Os níveis de ferritina foram determinados por quimioluminescência (Immulate e kits Immulate 2000 da DPC®). Todos os pacientes apresentavam valores de ferritina abaixo dos valores de referência (28 a 397 ng/mL para homens e 6 a 159 ng/mL para mulheres) sendo classificados como portadores de anemia ferropriva.

Um segundo grupo de 53 pacientes foi recrutado no Serviço de Patologia Clínica do IPSEMG e no Hospital das Clínicas da UFMG. A avaliação hematológica foi realizada no contador Advia 120 (Bayer) para os pacientes selecionados no primeiro Serviço e no contador Sysmex XE2100 (Sysmex) para os pacientes do segundo Serviço. Ambos contadores possuem controle de qualidade, permitindo inferir comparação dos dados. Estes pacientes também apresentavam idade > 18 anos e VCM < 80 fL, caracterizando um quadro de microcitose e hipocromia (MH). A eletroforese de hemoglobina foi realizada utilizando fitas de acetato de celulose, em pH alcalino, 8,6, em cuba/fonte Eletroforese Tecnow 7000. Em caso de suspeita de aumento de HbA<sub>2</sub>, foi realizada a sua dosagem por eluição da fita eletroforética. A ferritina foi dosada no aparelho Immulate® da DPC® em ambos laboratórios. Os pacientes deste segundo grupo com MH, foram classificados como portadores de β-talassemia menor quando apresentaram níveis séricos de ferritina normais, porém com HbA<sub>2</sub> aumentada (> 3,5 g/dL). Por outro lado, os pacientes com MH, com perfil hematológico sugestivo de α-talassemia, embora com pesquisa de HbH negativa foram confirmados como portadores do distúrbio α-talassêmico, na forma menor, por biologia molecular, tendo todos os cinco pacientes apresentado mutação 3.7.

Um terceiro grupo, também recrutado no Serviço de Patologia do IPSEMG, foi composto de 53 pacientes com AMH cujos níveis de ferritina estavam normais ou aumentados e que, juntamente com dados clínicos, caracterizam a ADC.

Na tentativa de estabelecer os valores supostamente úteis na diferenciação das AMH, foi plotada a curva ROC, utilizando o *software* Prisma 5, e estabelecidos os pontos de corte (*cutoffs*) para cada um dos parâmetros hematológicos e, ainda, determinadas a sensibilidade e especificidade para cada um destes pontos (Tabela 1).

## Resultados

Foi possível observar, pela análise da curva ROC, que a contagem de hemácias constitui o principal parâmetro auxiliar na discriminação das AMH. A Tabela 1 mostra maiores valores de sensibilidade e especificidade nos pontos de corte para a contagem de hemácias.

Tabela 1 - Sensibilidade, especificidade e pontos de corte (*cutoffs*) de parâmetros hematológicos na diferenciação entre AF, ADC e Tal.

Parâmetro	AF x Tal			AF x ADC			Tal x ADC		
	<i>Cutoff</i> <sup>a</sup>	Sensibilidade	Especificidade	<i>Cutoff</i> <sup>b</sup>	Sensibilidade	Especificidade	<i>Cutoff</i> <sup>c</sup>	Sensibilidade	Especificidade
Hm (10 <sup>6</sup> /µL)	> 5,0	83,0 (70,2; 91,9)	85,1 (80,5; 89,0)	> 4,0	75,5 (61,7; 86,2)	85,5 (80,9; 89,3)	< 4,4	90,6 (79,3; 96,9)	92,4 (81,8; 97,9)
Hb (g/dL)	> 10,7	71,7 (57,6; 83,2)	75,8 (70,4; 80,6)	> 9,8	62,3 (47,9; 75,2)	59,9 (54,0; 65,6)	< 10,4	81,1 (68,0; 90,6)	81,1 (68,0; 90,6)
VCM (fL)	< 70,2	83,0 (70,2; 91,9)	63,0 (57,1; 68,6)	< 75,2	79,2 (65,9; 89,2)	74,4 (69,0; 79,3)	> 71,3	90,6 (79,3; 96,9)	88,7 (77,0; 95,7)
HCM (pg)	< 21,7	73,6 (59,7; 84,7)	62,3 (56,4; 67,9)	< 24,1	77,4 (63,8; 87,7)	77,2 (71,9; 81,9)	> 23,0	86,8 (74,7; 94,5)	86,8 (74,7; 94,5)
CHCM (g/dL)	> 31,3	73,6 (59,7; 84,7)	52,2 (46,3; 58,1)	< 32,1	71,7 (57,6; 83,2)	75,4 (70,0; 80,3)	> 32,8	86,8 (74,7; 94,5)	49,1 (35,1; 63,2)
Pla (10 <sup>3</sup> /µL)	< 271,5	73,6 (59,7; 84,7)	71,3 (65,7; 76,4)	-	-	-	> 265,5	60,4 (46,0; 73,5)	66,0 (51,7; 78,5)

Hm - número de hemácias; Hb - hemoglobina; VCM - volume corpuscular médio; HCM - hemoglobina corpuscular média, CHCM - concentração de hemoglobina corpuscular média; Pla - número de plaquetas; a, b e c: valores de *Cutoff* correspondentes à talassemia menor, anemia ferropriva e anemia de doença crônica, respectivamente.

## Discussão

Uma análise dos dados apresentados na Tabela 1 referentes aos parâmetros hematológicos visando a discriminação entre as AMH mostrou que a contagem de hemácias se destacou por apresentar os maiores valores combinados de sensibilidade e especificidade e, portanto, maior área sob a curva ROC, em relação aos outros parâmetros avaliados.

Os dados analisados conjuntamente mostram que um *cutoff* superior a 5,0 milhões é compatível com talassemia menor sendo importante na discriminação entre este distúrbio e anemia ferropriva, enquanto na discriminação entre AF e ADC o valor de *cutoff* foi de 4,0 milhões, acima do qual o paciente é portador, possivelmente, de anemia ferropriva. No caso da comparação entre ADC e Tal, o valor de *cutoff* foi de 4,4 milhões interpretando-se, assim, que um paciente com contagem de hemácias inferior a 4,4 milhões é um possível portador de ADC.

Estes diferentes valores de *cutoff* estão condizentes com a fisiopatologia dos distúrbios.

O número de hemácias apresenta os menores valores no grupo ADC refletindo, provavelmente, a fisiopatologia do distúrbio, no qual verifica-se uma inibição da proliferação e diferenciação dos progenitores eritróides pela ação de citocinas próinflamatórias<sup>(5)</sup>. Por outro lado, o maior número de eritrócitos ocorre na talassemia menor. Este achado se relaciona à fisiopatologia deste distúrbio, na qual a precipitação das cadeias globínicas em excesso nos precursores eritróides e eritrócitos circulantes resulta em uma discreta eritropoese ineficaz, aumento da eritropoetina e, finalmente, uma leve à moderada expansão da eritropoese pela medula óssea na tentativa de compensar a anemia. Este mecanismo se manifesta por um aumento no número de hemácias do sangue<sup>(6,7,8)</sup>. De fato, o número de hemácias é útil como um parâmetro diagnóstico auxiliar, pois as talassemias menores produzem uma anemia microcítica associada a uma eritrocitose<sup>(9)</sup>. Segundo Hilliard & Berkow<sup>(6)</sup>, os pacientes com β-talassemia menor apresentam maior número de hemácias para o grau de anemia quando comparados aos pacientes portadores de anemia ferropriva. Já em pacientes portadores de AF observam-se valores intermediários para o número de hemácias, sem maiores decréscimos. Isto se deve ao fato de que na anemia ferropriva a proliferação de progenitores eritróides não se encontra comprometida como na ADC. Realmente, o mecanismo desencadeador da anemia ferropriva se refere à restrição de ferro à medula óssea, comprometendo de forma mais importante a síntese da hemoglobina e não a produção dos eritrócitos. Outras causas de anemia microcítica, tais como a ADC, estão tipicamente relacionadas com uma diminuição do número de hemácias proporcional ao decréscimo da concentração de hemoglobina<sup>(9)</sup>. Vários trabalhos investigaram a importância da contagem de eritrócitos na diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas<sup>(1,10,11,12,13)</sup> sendo verificado que uma eritrocitose foi comumente observada nos pacientes com talassemia menor e distintamente incomum nos pacientes portadores de anemia ferropriva e, ainda, que uma contagem de eritrócitos acima de cinco milhões é um índice bastante útil para a triagem das referidas anemias e suspeita de β-talassemia menor<sup>(1,10,12,13)</sup>.

Em conclusão, o presente estudo sugere que mesmo não sendo possível alcançar um diagnóstico definitivo das anemias microcíticas e hipocrômicas baseando-se apenas em parâmetros obtidos dos contadores automáticos, estes simples cálculos podem ser potencialmente úteis no rastreamento de pacientes portadores deste tipo de anemia. Apesar de sob o ponto de vista individual, não ser possível afirmar categoricamente o diagnóstico correto para cada paciente, uma vez que há considerável sobreposição de valores dos parâmetros hematológicos, a análise realizada por meio da curva ROC, reforça a idéia de que a contagem de hemácias constitui o principal parâmetro auxiliar na discriminação das anemias microcíticas. Desta forma, uma contagem exata de número de hemácias poderia oferecer um direcionamento para a escolha de testes laboratoriais confirmatórios com custos mais altos, se

necessário, e evitar um tratamento inapropriado, resultando assim em significativa redução de gastos pelo sistema de saúde.

### Referências

1. DEMIR, A. *et al.* Most reliable indices in differentiation between thalassemia trait and iron deficiency anemia. *Pediatr Int*, v. 44, n. 6, p. 6126, 2002.
2. WENTWORTH, P.; WENTWORTH, S. The value of the MCV index in the diagnosis of thalassemic and nonthalassemic microcytosis. *Am J Clin Pathol*, v. 107, n. 5, p. 619, 1997.
3. GILES, C. The platelet count and mean platelet volume. *Br J Haematol*, v. 48, n. 1, p. 317, 1981.
4. DAN, K. Thrombocytosis in iron deficiency anemia. *Intern Med*, v. 44, n. 10, p. 10256, 2005.
5. GUIDI, G. C.; SANTONASTASO, C. L. Advancements in anemias related to chronic conditions. *Clin Chem Lab Med*, v. 48, n. 9, p. 121726, 2010.
6. HILLIARD, L. M.; BERKOW, R. L. The thalassemia syndromes. *Prim Care Update for Ob/Gyns*, v. 3, n. 5, p. 15762, 1996.
7. HANDIN, R. J.; LUX, S. E.; STOSSEL, T. P. *Blood: principles and practice of hematology*. 2ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2003. 2304p.
8. SCHRIER, S. L.; ANGELUCCI, E. New strategies in the treatment of the thalassemias. *Annu Rev Med*, v. 56, p. 15771, 2005.
9. CLARKE, G. M.; HIGGINS, T. N. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. *Clin Chem*, v. 46, n. 8, p. 128490, 2000.
10. BEYAN, C.; KAPTAN, K.; IFRAN, A. Predictive value of discrimination indices in differential diagnosis of iron deficiency anemia and beta-thalassemia trait. *Eur J Haematol*, v. 78, n. 6, p. 5246, 2007.
11. FLYNN, M. M.; REPPUN, T. S.; BHAGAVAN, N. V. Limitations of red blood cell distribution width (RDW) in evaluation of microcytosis. *Am J Clin Pathol*, v. 85, n. 4, p. 4459, 1986.
12. MELO, M. R. *et al.* Uso de índices hematimétricos no diagnóstico diferencial de anemias microcíticas: uma abordagem a ser adotada? *Rev Assoc Med Bras*, v. 48, n. 3, p. 2224, 2002.
13. MADAN, N. *et al.* Phenotypic expression of hemoglobin A<sub>2</sub> in beta-thalassemia trait with iron deficiency. *Ann Hematol*, v. 77, n. 3, p. 936, 1998.

**Não foram enviadas imagens pelo autor (The author didn't send images)**