

GISÉLIA APARECIDA FREIRE MAIA DE LIMA

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**RECEPTOR SOLÚVEL DA TRANSFERRINA E PARÂMETROS
RETICULOCITÁRIOS NA BETA TALASSEMIA HETEROZIGOTA E NA
ANEMIA FERROPRIVA**

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas.
Campinas, 09 de fevereiro de 2001.

Profa. Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto
Orientadora



CAMPINAS

2001

200112154

GISÉLIA APARECIDA FREIRE MAIA DE LIMA

**RECEPTOR SOLÚVEL DA TRANSFERRINA E PARÂMETROS
RETICULOCITÁRIOS NA BETA TALASSEMIA E NA ANEMIA
FERROPRIVA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do título de
Mestre em Ciências Médicas, área de
Ciências Biomédicas.*

**ORIENTADORA: Prof^a Dr^a HELENA ZERLOTTI WOLF
GROTTO**

CAMPINAS

2001

iii



UNIDADE BC
N.º CHAMADA: T/ UNICAMP
L 628r
V. Ex.
TOMBO BC/ 44921
PROC. 16-392101
C D
PREÇO R\$ 11,00
DATA 26/06/01
N.º CPD

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

CM00157806-3

L628r

Lima, Gisélia Aparecida Freire Maia

Receptor solúvel da transferrina e parâmetros reticulocitários na beta talassemia heterozigota e na anemia ferropriva / Gisélia Aparecida Freire Maia de Lima. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientador: Helena Zerlotti Wolf Grotto

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

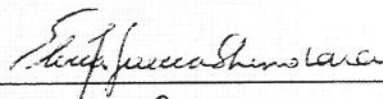
1. Ferro - metabolismo . 2. Anemia. I. Helena Zerlotti Wolf Grotto. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

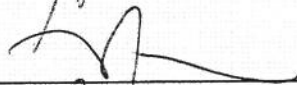
Orientador: Profa. Dra. Helena Zerlotti W. Grotto

Membros:

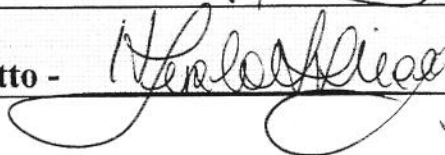
1. Profa. Dra. Elvira Maria G. Shinohara -



2. Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa -



3. Profa. Dra. Helena Zerlotti W. Grotto -



Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 09.02.2001

DEDICATÓRIA

*À meus pais Josemar e Nilza,
pelo estímulo e confiança,
à meu irmão Gilberto,
à minha irmã Gisleine pelo auxílio,
à meu filho Guilherme e à meu esposo
Paulo, pela paciência e palavras amigas
nos momentos que precisei.*

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra. Helena Zerlotti Wolf Grotto, pela constante dedicação, paciência, apoio e sabedoria.

À Profa Dra Paula Virginia Bottini, que em todos os momentos de dúvida esteve presente, auxiliando na parte técnica e escrita do presente trabalho.

Ao colega de trabalho Marco Antonio Moda, pela realização técnica da transferrina sérica.

Aos colegas de Pós- Graduação, José Fernando, Marina, Beatriz, Ronaldo, Ronei e Andréia, pelo auxílio técnico e didático.

À todos os colegas da Divisão de Patologia Clínica, que contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos do Laboratório de Hematologia, pelo constante apoio e compreensão, principalmente a minha amiga Clélia pelo seu incentivo, à Dra Maria de Fátima Pereira Gilberti pelas concessões quando foram necessárias e a Márcia pelo auxílio na realização técnica do receptor solúvel da transferrina no soro.

À Profa Maria de Fátima Sonati, pelas sugestões para meu crescimento acadêmico.

Aos professores do Departamento de Patologia Clínica que, direta ou indiretamente, contribuíram para minha formação.

Ao Departamento de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas, principalmente aos funcionários Cleide e Helymar, pela realização da parte estatística do trabalho.

À FAEP (auxílio 1123/97), pelo suporte financeiro para realização deste trabalho.

	<i>Pág</i>
RESUMO	xv
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO	23
1.1. Anemia ferropriva.....	35
1.2. Manifestações Laboratoriais.....	39
1.3. Talassemias.....	44
1.4. β Talassemias- Fisiopatologia.....	45
2. CAPÍTULO 1: Clinical use of soluble transferrin receptor and reticulocyte related parameters to distinguish beta thalassemia heterozygous from iron deficiency anemia	51
3. DISCUSSÃO	71
4. CONCLUSÕES	79
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
6. APÊNDICE 1: Dados hematimétricos e do metabolismo do ferro	93
7. APÊNDICE 2: Análise estatística descritiva	101
8. APÊNDICE 3: Teste de correlação	103
9. APÊNDICE 4: Curvas ROC e diagramas de pontos	105

	<i>Pág</i>
Figura 1: Modelo da molécula de transferrina, mostrando as pontes dissulfídicas comuns ao homens e a galinha () e as 4 exclusivas do homem (linhas tracejadas). Em (X) os sítios de ligação com o ferro.....	28
Figura 2: Esquema do receptor da transferrina humano com seu três domínios: <i>um grande domínio extracelular C- terminal</i> , <i>um domínio transmembrana e um domínio intracelular</i> (adaptado de PONKA & LOK, 1999).....	30
Figura 3: Esquema da captação de ferro mediada pelo receptor de transferrina em células de mamíferos.1) A transferrina se liga aos receptores na superfície das células; 2) Por um processo pH dependente, o complexo receptor-transferrina é englobado em vesículas endocíticas e internalizado pelas células; 3) O ferro é liberado da transferrina contida nas vesículas endocíticas por processo que envolve a acidificação dos endossomas; 4) O ferro liberado da transferrina é então transportado através da membrana endossomal; 5) A apotransferrina permanece ligado ao receptor em pH 5,5 retorna à superfície celular, onde é liberada (adaptado de PONKA & LOK, 1999).....	33
Figura 4: Estrutura dos genes da globina. Cada gene humano contém 3 éxons separados por 2 íntrons ou seqüência intermediária. No gene da globina- β , o éxon 1 codifica os aminoácidos 1 a 30, o éxon 2 os aminoácidos 31 a 140 e o éxon 3 os aminoácidos 105 a 146. As regiões 5'e 3' são regiões não traduzidas mas transcritas. A região promotora contém aproximadamente 100 pares de base algumas das quais são necessárias para a iniciação da transcrição (adaptado de LUKENS & LEE, 1998).....	45



RESUMO

A forma solúvel do receptor da transferrina (sTfR) tem sido indicada como um parâmetro útil na avaliação do estado do ferro e da atividade eritropoiética. Reticulócitos imaturos apresentam altas concentrações de receptor da transferrina na sua membrana. Nós testamos a correlação entre sTfR e parâmetros reticulocitários em pacientes com anemia ferropriva (AF) e β talassemia heterozigota (β tal hetero). Parâmetros laboratoriais relacionados ao estado do ferro e reticulócitos foram estudados a fim de estabelecer a utilidade clínica dos mesmos na distinção entre os dois tipos de anemia. As medidas dos reticulócitos foram obtidas utilizando contador hematológico semi-automatizado e as concentrações de sTfR foram determinadas por técnica imunoenzimática. Cinquenta pacientes com AF e quarenta e um com β tal hetero foram estudados. A contagem de reticulócitos foi significativamente mais elevada na β tal hetero quando comparada à AF e ao grupo controle. Por outro lado, os valores de sTfR apresentaram-se significativamente maiores na AF do que na β tal hetero. O melhor parâmetro para distinguir os dois tipos de anemia foi o sTfRI, obtido pela relação entre os níveis de sTfR e ferritina sérica. O compartimento de transporte foi melhor avaliado pela transferrina do que pela capacidade de ligação do ferro à transferrina (TIBC). A associação das medidas de ferro sérico e transferrina (índice de transferrina) melhorou a acurácia do teste de transferrina. A correlação entre reticulócitos altamente imaturos e nível de sTfR foi observado somente no grupo AF, sugerindo que a deprivação de ferro celular é o principal fator responsável pela estimulação da síntese de sTfR em células vermelhas imaturas. Valores elevados de sTfR em pacientes β tal hetero refletem a presença de eritropoiese inefetiva nesta hemoglobinopatia. Nós concluímos que as determinações de sTfR, ferritina e transferrina são parâmetros úteis e precisos na discriminação entre pacientes com AF e β tal hetero.

ABSTRACT

The soluble form of transferrin receptor (sTfR) has been pointed as an useful parameter to assess the iron status and erythropoiesis activity. Immature reticulocytes present high sTfR concentration. We tested the correlation between sTfR and reticulocyte parameters in iron deficiency anemia (IDA) and β thalassemia heterozygous (β thal hetero) patients. Laboratorial parameters related to iron status and reticulocytes were studied in order to establish the clinical use of them to distinguish both anemias. Reticulocyte measurements were obtained using a semi-automated analyzer and serum concentration of sTfR was determined by an immunoenzymatic technique. Fifty IDA and 41 β thal hetero patients were studied. Reticulocyte count was significantly higher in β thal hetero group than in IDA and control groups. On the other hand, sTfR analysis showed increased values in IDA patients, when compared to β thal hetero group. The better parameter to distinguish both anemias was sTfR index, obtained by the ratio sTfR/ferritin level. Transport compartment was better evaluated by serum transferrin measurement than transferrin iron binding capacity (TIBC) determinations. The association of serum iron with transferrin measurements (transferrin index) improved the accuracy of the transferrin test. The correlation between high immature reticulocytes and sTfR level was observed only in IDA group, suggesting that cellular iron deprivation is the main responsible factor for the sTfR synthesis stimulation in immature red blood cells. High sTfR values in β thal hetero patients reflect a degree of ineffective erythropoiesis in this hemoglobinopathy. We concluded that sTfR, ferritin and transferrin measurements are useful and precise parameters to discriminate IDA from β thal hetero patients.

Key words: anemia diagnosis, iron metabolism, microcytosis, reticulocyte fractions.

1. INTRODUÇÃO

A função da célula vermelha é transportar o oxigênio para os tecidos. Em termos fisiológicos a anemia pode ser definida como uma redução da capacidade de transporte de oxigênio pelo sangue, causando uma hipóxia tecidual (RAMZI et al, 1989). Apesar da natureza da anemia, quando a redução da massa de células vermelhas e, conseqüentemente, do nível de Hb, é suficientemente grave, o transporte de oxigênio está comprometido, ocorrendo diversas repercussões clínicas e laboratoriais.

A anemia pode ser classificada, baseando-se nos distúrbios de produção/destruição das hemácias, em :

- *Anemia por perda de sangue*: as alterações refletem, principalmente, a perda do volume sangüíneo, mais do que a queda da hemoglobina. A redução da oxigenação dos tecidos deflagra a produção da eritropoetina, e a medula óssea responde aumentando a eritropoiese. Logo após a perda de sangue as hemácias tem tamanho e cor normais (normocíticas e normocrômicas). Todavia, à medida que a medula começa a se regenerar, ocorrem alterações no sangue periférico, como o aparecimento de macrócitos policromatófilos e um aumento do número de reticulócitos.
- *Anemia por um ritmo acelerado de destruição das hemácias*: Caracteriza-se pelo encurtamento da vida da hemácia, acúmulo dos produtos do catabolismo da hemoglobina e acentuado aumento da eritropoiese dentro da medula.
- *Anemia por produção prejudicada das hemácias*: Caracteriza-se por distúrbios da proliferação e diferenciação da célula tronco, e distúrbio da proliferação e amadurecimento dos eritroblastos (RAMZI et al, 1989).

A anemia pode, ainda, ser classificada de acordo com as características morfológicas das hemácias em: macrocíticas, normocíticas e microcíticas, levando-se em conta os valores dos índices hematimétricos e a análise do esfregaço sangüíneo (HOFFBRAND & PETTIT, 1995).

As anemias microcíticas e hipocrômicas compartilham uma importante característica patogênica: síntese de hemoglobina quantitativamente deficiente, freqüentemente associada à utilização prejudicada de ferro ou a uma deficiência real de ferro (DI GREGORIO et al, 1998).

A biossíntese de hemoglobina requer que seus três componentes - ferro, protoporfirina e globina - sejam fornecidos em quantidades ótimas para a síntese protéica do eritrócito em desenvolvimento.

O ferro é essencial à vida. Seu papel no metabolismo dos mamíferos inclui diversas funções, tais como: envolvimento no transporte e estoque de oxigênio, liberação de energia, transporte de elétrons, conversão de ribose em desoxirribose, entre outras (COOK et al, 1992, PONKA et al, 1998, BAYNES, 1996).

Normalmente o conteúdo total de ferro no corpo é de cerca de 2g nas mulheres e 6g nos homens. Aproximadamente 60 a 70% é encontrado na hemoglobina, 4% na mioglobina e 1% em vários compostos heme, catalases e citocromos, 0,1% combinados com a transferrina e 10 a 30% no fígado como ferritina (PONKA et al, 1998). O conteúdo total de ferro no organismo é dividido em três compartimentos: funcional, de estoque e de transporte

- *compartimento funcional*: é o ferro envolvido no metabolismo celular; este ferro está contido na hemoglobina e mioglobina.
- *compartimento de estoque*: o ferro absorvido que excede o requerido pelo compartimento funcional é estocado como ferritina e hemossiderina. O compartimento de estoque tem como função principal repor o ferro consumido pelo compartimento funcional.
- os compartimentos de estoque e funcional são ligados por um pequeno *compartimento de transporte*, que é composto em grande parte pela molécula de transferrina. Quando o compartimento de estoque de ferro é exaurido, o nível do ferro complexado à transferrina torna-se criticamente comprometido (BAYNES, 1996, COOK et al, 1992).

O ferro é absorvido como Fe^{++} no duodeno e jejuno proximal. A absorção de ferro pela mucosa ocorre através de duas vias diferentes. A principal delas é através da absorção do heme originário da hemoglobina, da mioglobina e de outras proteínas animais. O heme é liberado de suas apoproteínas pela ação dos ácidos gástricos, sendo então absorvido diretamente pelas células da mucosa. Uma vez no interior das células, o heme é enzimaticamente degradado liberando o ferro. Por outro lado, somente cerca de 1 a 2% do ferro não heme é absorvido através de mecanismos complexos mal conhecido. A absorção do ferro é regulada de acordo com a necessidade de ferro pelas células (RAMZI et al, 1986, FAIRBANKS & BEAUTLER, 1995, WICK et al, 1996). Após a absorção, o ferro é transportado no plasma combinado à uma glicoproteína denominada transferrina, sintetizada principalmente no fígado e em menor quantidade no sistema retículo endotelial e em glândulas endócrinas, como testículos e ovários. Essa proteína tem peso molecular de aproximadamente 80 KDa e tem uma vida média de cerca de 7 dias (COOK et al, 1992, COOK et al, 1993, PONKA et al, 1998).

A transferrina é uma glicoproteína monomérica constituída de dois domínios homólogos, cada um com uma alta afinidade de ligação ao Fe^{+++} (PONKA et al, 1998). A ligação de ferro à transferrina é um processo pH dependente, uma propriedade que está envolvida no mecanismo fisiológico de liberação do ferro para a sua utilização dentro da célula (WORKWOOD, 1997a). A transferrina no plasma está saturada em 30% com o ferro. Através de estudos cinéticos e por termodinâmica, sabe-se que a transferrina pode estar presente no plasma sob quatro formas: apotransferrina livre do ferro, transferrina diférrica totalmente saturada e transferrina monomérica contendo ferro ligado ao terminal N ou terminal C (PONKA et al, 1998).

O gene da transferrina humano está localizado na porção distal do braço longo do cromossomo 3 (3q21→3qter) e é composto por quinze éxons distribuídos por 30 quilobases do DNA genômico. Baseado no estudo da estrutura protéica e na analogia do gene da transferrina com o gene da ovotransferrina, é sugerida a existência de dois éxons adicionais. A análise da estrutura gênica sugere a ocorrência de duplicação gênica na evolução da transferrina. Um “crossing-over” desigual entre dois genes primitivos originaria a duplicação de vários éxons e introns nas duas metades do gene humano da

transferrina. Mutações subsequentes resultariam na diversidade da estrutura dos éxons e tamanhos variáveis dos introns (HARFORD et al, 1994).

A cadeia polipeptídica da transferrina possui 679 aminoácidos. Estudos com raio X cristalográfico verificaram que a proteína se dobra entre os dois domínios que contém os sítios de ligação do ferro. Dezenove pontes dissulfeto, sendo oito no domínio N-terminal e onze no domínio C-terminal, ligam as porções dobradas da cadeia polipeptídica (Figura 1).

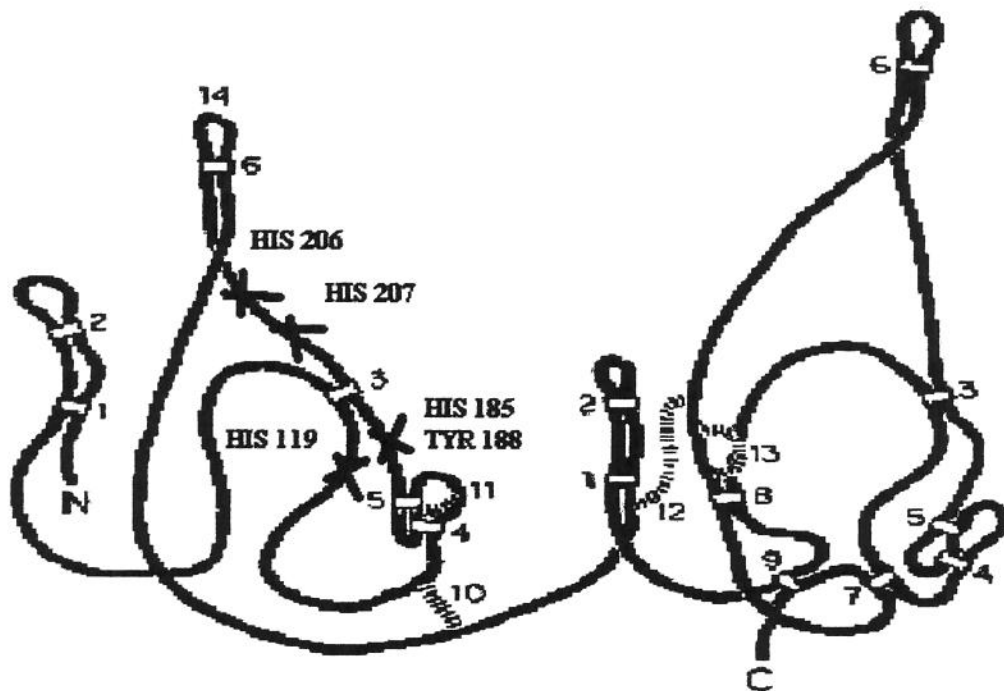


Figura 1: Modelo da molécula de transferrina, mostrando as pontes dissulfídicas comuns ao homem e a galinha (□) e as 4 exclusivas do homem (linhas tracejadas). Em (X) os sítios de ligação com o ferro.

A presença de dois locais de ligação do ferro com comportamento não homogêneo, tem levado à hipótese de diferentes funções em cada um desses sítios: um sítio de ligação da transferrina liberaria ferro preferencialmente para os reticulócitos, enquanto o outro sítio poderia ser específico para tecidos não eritróides. Outras evidências tem indicado que as duas moléculas de transferrina contendo ferro, ligadas ao domínio

n-terminal ou c-terminal são similares, ou idênticas na sua capacidade de liberar ferro para as células (HARFORD et al, 1994, PONKA et al, 1998).

Em 1963, JANDL e colaboradores sugeriram a existência de um receptor específico para transferrina na membrana de reticulócitos. entretanto, a caracterização e purificação desse receptor aconteceram somente décadas depois. foi observado há mais de 20 anos, por microscopia eletrônica, que a transferrina ligava-se a receptores e, através de vesículas endocíticas, ingressava nos reticulócitos (PONKA et al, 1998, PONKA & LOK, 1999).

O receptor de transferrina humano é um homodímero de duas subunidades transmembrana idênticas, cada uma de 84.940 da e contendo 760 aminoácidos. as subunidades são ligadas por duas pontes dissulfídicas nas posições 89 e 98. cada subunidade é constituída por três domínios: *o domínio citoplasmático* com 61 resíduos , um pequeno *segmento transmembrana* de 28 aminoácidos e um grande *segmento extracelular* de 671 aminoácidos (FLOWERS et al, 1989, baynes, 1996, allen et al, 1998, PONKA et al, 1998, PONKA & LOK, 1999) (figura 2).

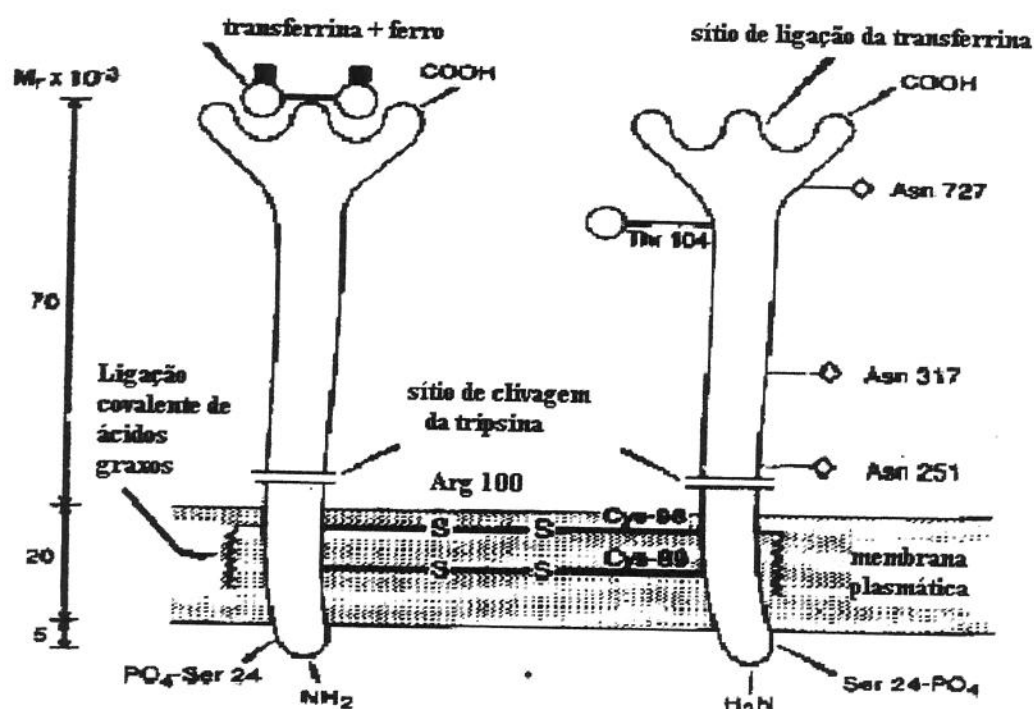


Figura 2: Esquema do receptor da transferrina humano com seu três domínios: *um grande domínio extracelular C-terminal, um domínio transmembrana e um domínio intracelular* (adaptado de PONKA & LOK, 1999).

O grande domínio extracelular contém três sítios de glicosilação nos três resíduos asparagina, e um sítio de glicosilação no resíduo treonina. A glicosilação parece ser necessária para a função normal do receptor da transferrina. O receptor mutado, com ausência dos sítios de glicosilação, tem a atividade de ligação com a transferrina enfraquecida (WILLIAMS & ENNS, 1991); e a perda do sítio da treonina está associado do aumento da sensibilidade do receptor à clivagem proteolítica (RUTLEDGE et al, 1994b). A porção extracelular da subunidade do receptor contém um sítio de tripsina sensível à clivagem proteolítica e produz um fragmento de 70 KDa. Esse fragmento retém sua capacidade de ligação à transferrina, mas perde a atividade de ligação às células. O local de ligação da transferrina está situado no domínio extracelular do receptor e cada subunidade do receptor se liga a uma molécula de transferrina. A função da seqüência transmembrana é de servir como uma âncora para a inserção do receptor à membrana da

célula. A porção do receptor que está exposta ao citoplasma perto da membrana plasmática, tem uma serina fosforilada. O processo de fosforilação e desfosforilação tem sido considerado como sinal para a internalização do receptor da transferrina (PONKA & LOK, 1999, HARFORD et al, 1994), embora não haja consenso na literatura sobre o papel da fosforilação do receptor no processo de endocitose (ROTHENBERGER et al, 1987). O receptor da transferrina é codificado por um gene de 32 Kb que contém 19 éxons e que se localiza no cromossomo 3, na mesma região onde o gene da transferrina foi mapeado (MILLER et al, 1983, ENNS et al, 1982).

O controle da síntese do receptor da transferrina é bastante interessante e está associado ao controle da síntese da ferritina. Em células não eritróides a expansão do pool intracelular do ferro leva à uma diminuição da expressão dos receptores da transferrina e a um aumento na síntese de ferritina. Mecanismo inverso acontece quando há deprivação de ferro intracelular. Participam desse processo as proteínas reguladoras do ferro (IRP) e os elementos responsivos ao ferro (IRE). IREs foram primeiramente identificados na região não traduzida da porção 5' do RNAm da ferritina, como mediadoras da inibição da transcrição do RNAm da ferritina em células privadas de ferro. Posteriormente, cinco IREs similares foram identificadas na porção 3' não traduzida do RNAm do receptor da transferrina. Esses IREs conferem estabilidade do RNAm do receptor da transferrina quando há necessidade de internalização de ferro na célula. Os IREs são seqüências nucleotídicas reconhecidas por proteínas citosólicas, as IRPs (IRP1 e IRP2). Em células não eritróides a interação entre os IRPs e IREs controla o metabolismo do ferro, através do seguinte mecanismo: quando o ferro é escasso, a IRP interage com o IRE do RNAm da ferritina, produzindo uma redução na transcrição do RNAm e, conseqüentemente, na síntese de ferritina. Por outro lado, a interação IRP-IRE no receptor da transferrina resulta na proteção do RNAm contra a degradação, favorecendo a sua síntese. O oposto ocorre quando os níveis de ferro estão elevados. Há uma inativação do IRP1 e degradação do IRP2, resultando em uma transcrição eficiente do RNAm da ferritina e uma rápida degradação do RNAm do receptor da transferrina (PONKA et al, 1997, HARFORD et al, 1994).

Cada receptor pode se ligar a uma ou duas moléculas de transferrina. Em pH neutro, o receptor da transferrina tem uma alta afinidade pela transferrina diférrica, afinidade intermediária pela transferrina monoférrica e muito pouca pela apotransferrina (COOK et al, 1993). No processo de internalização do complexo transferrina-ferro, o primeiro evento que ocorre é a ligação da transferrina ao seu receptor específico na membrana celular. As invaginações da membrana celular formam vesículas endocíticas cuja superfície é coberta por proteínas. Devido à acidificação da organela, o ferro é liberado da transferrina, enquanto a apotransferrina permanece ligada aos seus receptores. O receptor da transferrina é reciclado para a membrana celular, carregando a apotransferrina de volta à superfície celular, onde o pH neutro causa a sua liberação. A duração do ciclo varia de 3 a 16 minutos (BEGUIN, 1992, COOK et al, 1993, BAYNES, 1996, PUNNONEN et al, 1997, COOK et al, 1999, PONKA & LOK, 1999) (Figura 3).

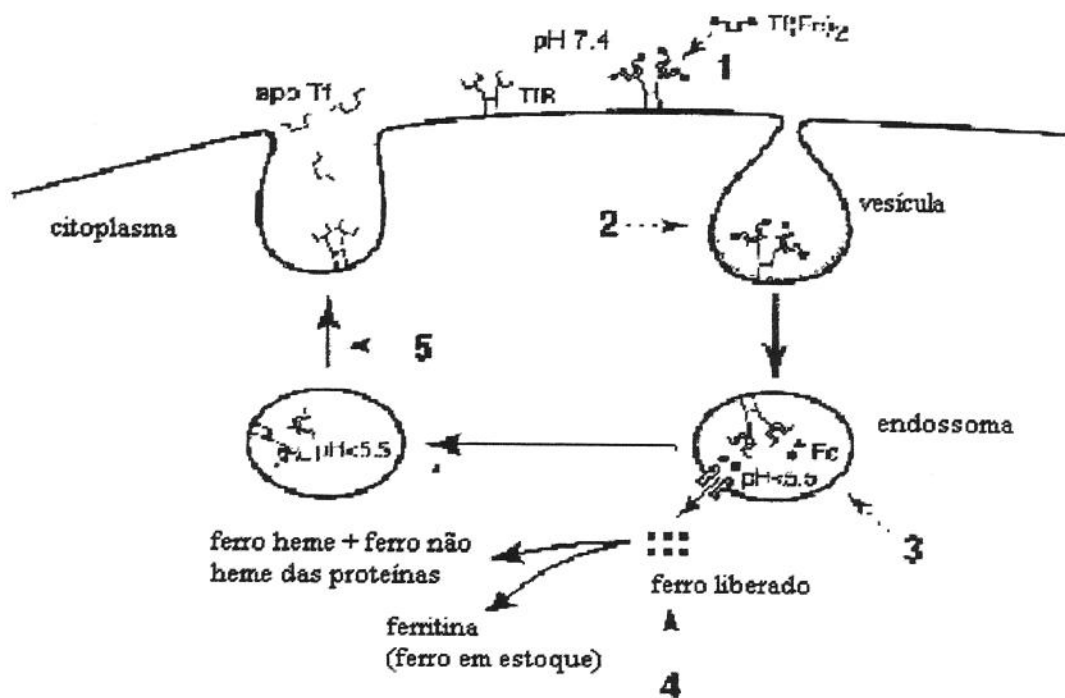


Figura 3: Esquema da captação de ferro mediada pelo receptor de transferrina em células de mamíferos. 1) A transferrina se liga aos receptores na superfície das células; 2) Por um processo pH dependente, o complexo receptor-transferrina é englobado em vesículas endocíticas e internalizado pelas células; 3) O ferro é liberado da transferrina contida nas vesículas endocíticas por processo que envolve a acidificação dos endossomas; 4) O ferro liberado da transferrina é então transportado através da membrana endossomal; 5) A apotransferrina permanece ligada ao receptor em pH 5,5 retorna à superfície celular, onde é liberada (adaptado de PONKA & LOK, 1999).

Praticamente todas as células possuem receptores de transferrina em sua superfície, sendo mais abundantes no *éritron*, fígado e placenta. No adulto normal cerca de 80% dos receptores encontram-se no tecido eritróide da medula óssea, havendo um aumento no seu número proporcionalmente ao estímulo da eritropoiese. O número dos receptores aumenta gradativamente à medida que se desenvolve a eritropoiese: é discreto

nos progenitores eritróides e alcança até 800.000 por célula na fase do normoblasto intermediário; diminui até cerca de 100.000 no reticulócito e é ausente nas células vermelhas maduras. As membranas microvilosas da placenta são ricas em receptores, cujo número se eleva no decorrer da gravidez. Nos hepatócitos há cerca de 20.000 a 50.000 receptores por célula, os quais desaparecem na sobrecarga de ferro. Receptores são encontrados também em grande quantidade em células linfóides estimuladas por mitógenos e na superfície de células tumorais malignas, o que é explicado pelo maior requerimento de ferro para síntese de enzimas como a ribonuclease redutase, essencial para a formação de novas células (BEGUIN, 1992).

A presença da forma solúvel do receptor da transferrina em soro humano foi descrita pela primeira vez por KOHGO et al em 1986. Corresponde à forma truncada do receptor da transferrina, sendo constituída somente pelo domínio extra-celular. Apresenta-se como uma proteína simples de cerca de 85 kDa de peso molecular e é originada de mecanismos proteolíticos ainda não bem definidos. A análise da seqüência de aminoácidos revela que os resíduos 1-19 do receptor sérico são idênticos aos resíduos 101-119 do receptor intacto tecidual (SHIH et al, 1990). Foi demonstrado, ainda, que o evento da clivagem ocorre entre a arginina (100) e a leucina (101) (BAYNES et al, 1993). A proteólise máxima parece ocorrer na superfície dos exossomas contendo corpos multivesiculares precedentes à exocitose (BAYNES et al, 1993, RUTLEDGE et al, 1994a).

Os fatores que determinam quais receptores serão alvos de clivagem proteolítica não estão ainda esclarecidos. Estudos mostram que a transferrina diférrica pode reduzir a produção de receptores solúveis da transferrina, indicando um possível efeito de mecanismos intracelulares seletivos como importante controle de produção dos receptores (BAYNES, 1995). Outros dados sugerem que glicosilação na treonina (104) pode proteger o local de clivagem e que, modificações do produto de glicosilação, podem ocorrer com o envelhecimento do receptor, favorecendo o início da proteólise. Portanto, não está ainda esclarecido se a produção da forma solúvel do receptor reflete um processo degradativo ou se tem um significado funcional (RUTLEDGE et al, 1994b).

Após a internalização, liberação e utilização, o ferro remanescente é estocado pelo organismo, sob duas formas: ferritina e hemossiderina. A ferritina representa um importante mecanismo de proteção dos efeitos nocivos do ferro, se exposto à oxigenação. Está presente em todas as células e é composta de 24 unidades de apoferritina arranjadas de forma esférica, como uma concha, onde cerca de 4500 átomos de ferro podem ser seqüestrados e detoxificados como micelas de oxihidróxido férrico (HARFORD et al, 1994). A ferritina é encontrada em altas concentrações nas células do fígado, baço e medula óssea e menores concentrações são encontradas no plasma (WORKWOOD, 1997a). A liberação do ferro da ferritina é mediada por várias flavinas ou outros agentes redutores, como cisteínas, glutathione, ácido ascórbico ou quelantes que facilitam sua liberação (HARFORD et al, 1994).

A hemossiderina, outra forma de estoque de ferro intracelular, corresponde a agregados insolúveis de óxido de ferro e constituintes inorgânicos, resultantes da degradação da ferritina (HARFORD et al, 1994). É encontrada predominantemente nas células do sistema monócito-macrófago (medula óssea, células de Kupffer e baço) (FAIRBANKS & BEUTLER, 1995)

1.1. ANEMIA FERROPRIVA

A deficiência de ferro é a forma mais comum de deficiência nutricional, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, e é definida como um estado de balanço negativo do ferro, onde o suprimento de ferro é inadequado ao requerido pelo *éritron* e outros tecidos do organismo (HOFFBRAND & PETTIT, 1995).

Quando o nível de ferro corporal total começa a cair, segue-se uma seqüência característica de eventos. Primeiramente são exauridas as reservas de ferro nos hepatócitos e nos macrófagos do fígado, baço e medula óssea. Uma vez esgotadas as reservas, o conteúdo de ferro plasmático diminui e o fornecimento de ferro à medula torna-se inadequado para a síntese normal de hemoglobina. Finalmente, a quantidade de protoporfirina livre dos eritrócitos aumenta e tem início a produção de eritrócitos microcíticos. Eventualmente os níveis de hemoglobina permanecem normais (WICK et al, 1996).

Essa seqüência serve como base para a definição de três estágios progressivos da deficiência de ferro.

1. A *deficiência de ferro pré latente* ou a *depleção de ferro* que refere-se à redução de ferro nos locais de estoque, mas com níveis de ferro sérico normais. A detecção de tal condição depende da capacidade de avaliar as reservas de ferro. Além disso, como a absorção de ferro é inversamente proporcional às reservas de ferro, a taxa de absorção aumenta.

2. A *deficiência de ferro* existe quando as reservas de ferro estão exauridas, mas o nível de hemoglobina do sangue permanece mais alto do que o limite inferior normal. Nesse estágio, geralmente são detectadas certas anormalidades bioquímicas no metabolismo do ferro, como a redução do ferro sérico e da saturação de transferrina e um aumento na quantidade de protoporfirina livre nos eritrócitos. Outras observações incluem excreção de ferro urinário subnormal após injeção de desferrioxamina e capacidade de ligação do ferro à transferrina (TIBC) aumentada. O volume corpuscular médio (VCM) geralmente permanece dentro dos limites normais, mas alguns micrócitos podem ser observados no esfregaço sanguíneo

3. Quando a concentração de hemoglobina do sangue cai abaixo do limite inferior normal, desenvolve-se a *anemia ferropriva*, onde, além das alterações descritas acima, a microcitose e hipocromia são evidentes, (LEE, 1998, WICK et al, 1996, HILLMAN & FINCH, 1992)

São causas de deficiência de ferro: baixa ingestão de ferro, absorção prejudicada, perdas sangüíneas patológicas ou fisiológicas e utilização aumentada de ferro (LEE, 1998, PUNNONEN et al, 1997).

Como dito anteriormente, o ferro da dieta é melhor absorvido quando encontra-se na forma de heme, encontrado na mioglobina e hemoglobina da carne animal. No entanto, a maior parte do ferro da dieta não é ligada ao heme, como o ferro na farinha de trigo e nos ovos. O ferro não ligado ao heme tem uma disponibilidade limitada para absorção, porque pode haver a formação de complexos insolúveis como fosfatos, tanatos e oxalatos dos alimentos no estômago, e polímeros insolúveis de hidróxido de ferro no meio alcalino do duodeno. Em condições normais, a quantidade de ferro absorvida é suficiente para equilibrar a perda de ferro (0,6 a 2,1 mg) e para permitir o acúmulo de até 2000 mg de

depósito de ferro durante a vida. Quando o corpo absorve o ferro de uma boa dieta tão avidamente quanto possível (como ocorre na anemia ferropriva), a quantidade absorvida aumenta apenas entre 3 a 4 mg por dia. A anemia ferropriva é uma complicação freqüente (aproximadamente 50%) após cirurgias gástricas. Além disso, como os locais mais ativos de absorção de ferro estão no duodeno, o rápido trânsito intestinal que se segue à perda da função de reservatório no estômago, pode levar à diminuição de absorção. A deficiência de ferro é mais comum quando o duodeno sofre intervenção cirúrgica (LEE, 1998).

A perda sangüínea é a causa mais freqüente de anemia ferropriva. Para se avaliar o efeito da perda sangüínea sobre o balanço de ferro, pode-se considerar que 1,0 ml de sangue contém cerca de 0,5 mg de ferro. Assim, uma perda sangüínea constante de apenas 3 a 4 ml/dia (1,5 a 2 mg de ferro), pode resultar em balanço negativo de ferro (LEE, 1998, FAIRBANKS & BEUTLER, 1995).

O sangramento gastrointestinal é a causa mais comum de deficiência de ferro em homens adultos e é secundária apenas à perda sangüínea menstrual como causa de perda de ferro nas mulheres. Lesões ulcerativas, hérnia hiatal com traumatismo mucoso, ingestão de aspirina e anti-inflamatórios não-hormonais, infecções parasitárias e processos inflamatórios e malignos estão entre as causas mais comuns de perdas de sangue. Tais alterações podem passar despercebidas ou toleradas até que os sintomas de anemia sobrevenham (LEE, 1998, MASSEY, 1992)

A causa mais comum de deficiência de ferro em mulheres entre 15 e 45 anos é a perda sangüínea menstrual exacerbada. Em mulheres saudáveis, a média de fluxo sangüíneo menstrual é de cerca de 35 ml por período menstrual e o limite superior da normalidade é de cerca de 80 ml por período. Certos dispositivos contraceptivos intra-uterinos aumentam o fluxo sangüíneo menstrual enquanto os contraceptivos orais reduzem o fluxo sangüíneo (LEE, 1998).

Doações sucessivas de sangue podem levar à deficiência de ferro. Cada doação de sangue remove de 200 a 250 mg de ferro do organismo. Entre doadores de sangue a prevalência de anemia aumenta com a freqüência de doações; assim, após cinco doações em um ano, 8% dos doadores masculinos e 38% dos doadores femininos apresentaram reservas de ferro reduzidas (FAIRBANKS & BEAUTLER, 1995).

A deficiência de ferro afeta 50% ou mais dos pacientes tratados com hemodiálise quando as transfusões sanguíneas estão restritas. As causas podem estar associadas com o processo de diálise, perdas gastrointestinais, redução de ferro dietético e má absorção (LEE, 1998).

Nos lactentes, a deficiência de ferro está relacionada basicamente à uma dieta restrita ao leite materno por tempo prolongado. A eritropoiese diminui profundamente nos primeiros dias de vida extra uterina, e o nível de hemoglobina cai de 18 g/dl ao nascimento para 11 g/dl com 6 semanas de vida. O bebê normal possui ferro proveniente da hemólise das hemácias senis, o que é suficiente para sintetizar hemoglobina durante os primeiros 4 a 6 meses de vida. Depois disso, no entanto, o lactente normal precisa absorver de 0,8 a 1,0 mg de ferro por dia para que haja uma síntese adequada de hemoglobina. O leite é uma fonte pobre de ferro, contendo aproximadamente 0,5 mg/l, dos quais apenas 10%, ou 0,05 mg/l, são absorvidos. Assim, a criança alimentada exclusivamente com leite, sem a suplementação adequada, com outros alimentos fornecedores de ferro, pode desenvolver a anemia no primeiro ano de vida (RAPPAPORT, 1990).

Entre 1 e 12 anos, há necessidade de um balanço positivo de ferro de cerca de 0,2 a 0,3 mg/dia. O repentino crescimento que ocorre entre 11 e 14 anos de idade requer um balanço positivo de ferro de cerca de 0,5 mg/dia em meninas e 0,6 mg/dia em meninos. Após ocorrer a menstruação as necessidades das meninas equivalem a de mulheres adultas (LEE, 1998).

A gravidez constitui um importante esgotamento das reservas de ferro nas mulheres em idade fértil, uma vez que há uma grande necessidade de ferro materno que será utilizado na eritropoiese fetal. Cada gravidez resulta em uma perda média de 680 mg de ferro. Na ausência de suplementos, a anemia ferropriva ocorre com frequência, geralmente manifestando-se no terceiro trimestre da gravidez (CARRIAGA et al, 1991).

Três fatores estão relacionados à patogênese da anemia ferropriva:

- *Síntese prejudicada de hemoglobina*, conseqüente ao suprimento reduzido de ferro. Quando a saturação de transferrina cai abaixo de 16% o suprimento de ferro à medula é insuficiente para preencher as necessidades basais para a produção de hemoglobina. Cada célula produzida contém menos hemoglobina, resultando em microcitose e hipocromia.

- *Defeito generalizado na proliferação celular.* Na deficiência de ferro, o número de eritrócitos diminui, assim como a quantidade de reticulócitos e o grau de hiperplasia eritróide na medula em relação ao grau de anemia, confirmando que a proliferação celular é deficiente.

- *Sobrevivência reduzida dos eritrócitos,* encontrado apenas quando a anemia é grave. O principal local de destruição das hemácias é o baço. A viabilidade reduzida dos eritrócitos está associada com a deformação da membrana. Essa anormalidade parece resultar da lesão oxidativa na membrana que, por sua vez, pode ser uma consequência de atividade reduzida da glutathion peroxidase (LEE, 1998) .

1.2. MANIFESTAÇÕES LABORATORIAIS

A anisocitose é um sinal precoce da deficiência de ferro. Pode apresentar-se acompanhada de hipocromia, ovalócitos, células em alvo e eliptócitos hipocrômicos. À medida que a deficiência de ferro progride, as alterações tornam-se mais evidentes, associando-se à queda da hemoglobina, VCM (volume corpuscular médio) e HCM (conteúdo corpuscular médio). O RDW ("red cell distribution width") é um índice associado ao grau de anisocitose. Mede o grau de dispersão das hemácias de acordo com o volume eritrocitário e freqüentemente está elevado na anemia ferropriva, (COOK et al, 1992, LIMA et al, 1996).

Os leucócitos geralmente estão em número normal, mas pode ocorrer uma leve granulocitopenia em casos de anemia ferropriva de longa duração. A trombocitopenia e trombocitose tem sido atribuídas à deficiência de ferro. Trombocitose tem sido relatada em 50 a 75% dos adultos com anemia ferropriva clássica, devido a perda crônica de sangue. Em bebês e crianças a trombocitopenia e trombocitose ocorrem com freqüências similares. A queda do número de plaquetas em crianças está associada à anemia grave (LEE, 1998).

A celularidade da medula e a relação entre células eritróides e mielóides são variáveis. Na deficiência de ferro grave, o eritroblasto da medula pode ter o volume menor que o normal, com citoplasma irregular contendo pouca hemoglobina. Entretanto, a detecção de alterações morfológicas na medula não é suficiente para se fazer o diagnóstico diferencial entre as causas de anemia. A diminuição ou ausência de hemossiderina na

medula é característica da deficiência de ferro. A avaliação dos estoques de ferro nos macrófagos da medula é um meio sensível e real para o diagnóstico laboratorial da anemia por deficiência de ferro (FAIRBANKS & BEAUTLER, 1995).

A concentração de ferro sérico é usualmente baixa na anemia ferropriva não tratada. Entretanto o ferro sérico pode estar normal nos primeiros estágios da depleção do ferro. A medida da concentração de ferro sérico está sujeita a muitas variáveis que podem gerar erros substanciais nos resultados. Essas variáveis incluem: processamento inadequado, contaminação de reagentes com pequena quantidade de ferro, turbidez e presença de hemoglobina livre, que podem resultar em valores erroneamente elevados. A concentração de ferro também sofre influências fisiológicas, como a oscilação observada no decorrer do dia: está mais elevada pela manhã, declinando até um valor mínimo próximo às 9:00 h da noite. Durante o período menstrual está diminuída, tanto sob controle hormonal normal, como com uso de contraceptivos orais. Nos processos inflamatórios e neoplásicos, assim como após infarto agudo do miocárdio, a concentração de ferro pode alcançar valores sugestivos de deficiência de ferro. Por outro lado, durante a quimioterapia antineoplásica os níveis de ferro podem estar bastante elevados (FAIRBANKS & BEAUTLER, 1995).

A capacidade de ligação do ferro à transferrina é uma medida indireta da quantidade de transferrina circulante no sangue (YAMANISHI et al, 1997). Normalmente um terço dos sítios de ligação da transferrina está ocupado com ferro, o que confere uma porcentagem de saturação normalmente entre 30 e 50%. Na anemia ferropriva o TIBC está freqüentemente elevado, enquanto a saturação da transferrina é menor que 15% (COOK et al, 1992, BAYNES, 1996, GAMBINO et al, 1997).

Os níveis de ferritina sérica são as melhores medidas da reserva de ferro. Na anemia ferropriva, o valor em geral é inferior a 12 ng/dL, na ausência de doença associada. De todos os testes para a deficiência de ferro, a determinação de ferritina sérica é a mais útil levando a um diagnóstico bem sucedido em 91% dos casos (COOK et al, 1992, BAYNES, 1996). Existem três circunstâncias em que a ferritina não pode ser utilizada como medida do estoque de ferro: na lesão hepática, nos estados inflamatórios e infecciosos e na presença de alguns tumores. Por ser uma proteína de fase aguda, pode apresentar valores erroneamente elevados, mesmo que haja deprivação do ferro (RAMZI et al, 1989, PONKA et al, 1998, MAST et al, 1998).

A determinação do receptor solúvel da transferrina através de métodos imunológicos é bastante sensível e reflete a quantidade de receptor celular. A concentração sérica do receptor da transferrina está elevada quando há expansão da massa de células eritróides imaturas, como nas talassemias, anemias hemolíticas e policitemias. Por outro lado, está diminuída em pacientes com anemia aplástica, anemia pós transfusional e na insuficiência renal crônica. Como um dos estímulos para a síntese dos receptores é a deprivação intracelular de ferro, altos níveis de sTfR são observados na anemia ferropriva (PONKA & LOK, 1999).

A avaliação dos receptores solúveis da transferrina tem sido apontada como de grande utilidade na distinção entre anemia de doença crônica e anemia ferropriva. A ferritina não fornece informações totalmente confiáveis na anemia de doença crônica, mas os receptores da transferrina não sofrem interferência quando da associação com processos inflamatórios ou infecciosos (FERGUSON et al, 1992).

Ao lado do hemograma, a contagem de reticulócitos é um dos primeiros exames laboratoriais requisitados quando da suspeita de anemia ferropriva. Em geral revela valores normais ou discretamente diminuídos (ELGHETANY & DAVEY, 1996). Sendo uma técnica de precisão limitada, a quantificação dos reticulócitos tem sido relegada a segundo plano, embora possa fornecer informações interessantes quanto à cinética medular e atividade eritropoiética. O reticulócito corresponde ao último estágio de maturação da série eritróide. A primeira descrição do reticulócito data de 1860, quando Erb usou ácido picríco e ácido acético para precipitar o retículo intracelular. Heilmeyer, em 1932, propôs a classificação dos reticulócitos de acordo com a intensidade de coloração, em:

- grupo 0- normoblasto- célula com núcleo e denso retículo perinuclear
- grupo I- retículo na forma de um grumo denso
- grupo II- rede de retículo mais frouxa
- grupo III- retículo como uma fina rede que está se desintegrando
- grupo IV- aparecem somente poucos grânulos esparsos pela célula.

Nos anos 50 SEIP quantificou os reticulócitos e determinou os valores de referência para cada estágio de desenvolvimento. No indivíduo normal, cerca de 61% dos reticulócitos circulantes são do grupo IV, 32% do grupo III, 7% do grupo II e apenas 0,1% pertencem ao grupo I (KOEPEKE & KOEPEKE, 1986, ROWAN et al, 1996).

O conteúdo intracelular encontrado nos reticulócitos corresponde à mitocôndrias, ribossomas, centríolos e remanescentes de corpúsculos de Golgi. Após as células vermelhas perderem seu núcleo, a síntese de proteínas torna-se limitada à formação de globina e heme. O RNA ribossomal é gradualmente perdido durante cerca de 4 dias em que o reticulócito permanece na medula óssea. No último desses quatro dias, o reticulócito normalmente aparece na circulação sanguínea. Quando a eritropoiese é estimulada, o tempo intramedular é encurtado, com correspondente prolongamento do tempo de maturação no sangue periférico. Como resultado, há um aumento na circulação de reticulócitos contendo grande quantidade de RNA (ROWAN et al, 1996).

Os reticulócitos expressam grande quantidade de receptores de transferrina em sua membrana, comprometidos com a internalização do ferro para que haja a síntese de hemoglobina. Esses receptores diminuem à medida que o reticulócito vai se tornando mais maduro (CORBERAND , 1996).

A comprovação direta da atividade eritropoiética avaliada por estudos ferrocínéticos, mostra que há uma ampla correlação entre o grau de atividade da medula e a contagem de reticulócitos. A razão reticulócitos/células maduras indica o balanço de produção de células vermelhas em relação à sua taxa de destruição. Assim, quando a vida média das células vermelhas diminui, a proporção de novas células na circulação começa a aumentar (MACDOUGAL et al, 1992).

A quantificação dos reticulócitos feita por métodos manuais, através da observação microscópica das células coradas com corantes supra-vitais, é altamente imprecisa. Contribuem para essa imprecisão o pequeno número de células analisadas e a falta de uniformidade na definição dos reticulócitos, devido, em parte, à dificuldade do observador em identificá-las e em parte a problemas técnicos de coloração e da confecção do próprio esfregaço sanguíneo (CORBERAND, 1996).

A automação da contagem de reticulócitos tornou a quantificação muito mais precisa e permitiu que novos parâmetros pudessem ser conhecidos e aplicados em diferentes situações clínicas (BRUGNARA, 1998).

Os métodos baseados em técnicas de fluorescência surgiram nas décadas de 50 e 60. A “acridine orange” foi descrita em 1952 por Kosinov e Mai, e foi introduzida na prática clínica por Vander e col em 1963, usando um procedimento não automatizado. Em 1970 Thær mediu a quantidade de RNA corado com “acridine orange” em reticulócitos usando microscópio para fluorescência. O citômetro de fluxo tem a vantagem de analisar um grande número de células. Normalmente conta cerca de 100.000 eritrócitos e 1.600 reticulócitos, diminuindo, assim, o coeficiente de variação entre as contagens e aumentando o limite de confiança do teste. Vários corantes tem sido utilizados em citometria de fluxo para contagem de reticulócitos, como a “acridine orange”, pironina Y, tioflavina T, dimetiloxacarbocianina, “thiazole orange”, brometo de etídio e auramina O. A maior parte deles cora RNA e DNA e diferem entre si quanto ao tempo de incubação necessário para que haja a reação (CORBERAND, 1986).

A análise por citometria de fluxo permite identificar diferentes graus de maturidade dos reticulócitos, discriminando áreas de reticulócitos com baixa fluorescência (LFR), média fluorescência (MFR) e de alta fluorescência (HFR), sendo esta última a mais imatura. A introdução desses novos parâmetros reticulocitários ampliou a utilização clínica da contagem de reticulócitos. Tem sido de grande valia na avaliação da atividade eritropoiética da medula, na diferenciação das anemias responsivas e não responsivas ao tratamento, na resposta medular pós quimioterapia ou transplante de medula óssea e no monitoramento do tratamento com eritropoetina recombinante (DALAL et al, 1996, TESTA et al, 1997, BRUGNARA, 1998, CORBERAND, 1996, GROTTTO et al, 1999).

No estudo da relação entre diferentes tipos de anemias e a contagem de reticulócitos por citometria de fluxo, PATERAKIS et al (1991), relataram que nos β talassêmicos heterozigotos os valores eram significativamente superiores aos dos indivíduos normais, refletindo uma maior atividade eritropoiética nos talassêmicos. YOLDI et al (1991), sugeriram que a fração de alta imaturidade dos reticulócitos poderia ser útil na diferenciação entre anemia ferropriva e β talassemia heterozigota.

1.3. TALASSEMIAS

As talassemias são alterações hereditárias, de distribuição mundial, causadas por mutações que afetam a síntese de uma ou mais cadeias globínicas (BUNN & FORGET 1986, TURGEON et al, 1999). A característica comum desses distúrbios é a produção prejudicada das cadeias polipeptídicas da hemoglobina, isto é, a velocidade de síntese está diminuída mas a cadeia formada é, na maioria dos casos, estruturalmente normal (ELGHETHANY & DAVEY, 1996, BUNN & FORGET, 1986).

A anormalidade comum às todas β talassemias é a falta total (β^0 talassemia) ou a redução (β^+ talassemia) da síntese das cadeias β de globina estruturalmente normais (WEATHERALL, 1995).

A hemoglobina do adulto ou Hb A, contém duas cadeias α e duas cadeias β de globina. Os genes que codificam as cadeias de globina β estão localizados no braço curto do cromossomo 11 e o *cluster* α responsável pela produção das cadeias α está localizado no braço curto do cromossomo 16. O gene α é duplicado em $\alpha 1$ e $\alpha 2$. Cada gene de globina β possui três seqüências de codificação ou *éxons*, que são interrompidas por duas seqüências intermediárias ou *íntrons* (Figura 4). Ao lado da extremidade 5' do gene da globina existe uma série de seqüências promotoras não traduzidas que são necessárias para a iniciação da síntese de RNAm da globina β . Tal como ocorre com todos os genes eucarióticos, a biossíntese das cadeias da globina começa com a transcrição dos genes da globina dentro do núcleo. O transcrito inicial do RNAm contém uma cópia de todo o gene, incluindo todos os *éxons* e *íntrons*. Esse grande precursor do RNAm é processado e convertido em RNAm citoplasmático e se associa aos ribossomas nos quais ocorre a tradução.

Os defeitos moleculares que originam as β talassemias são resultantes de deleções do gene da globina β e de mutações não delecionais, que podem afetar a transcrição, processamento ou tradução do RNAm da globina β . Já estão descritas mais de 100 diferentes mutações responsáveis pelas talassemias β^0 e β^+ (HOFFBRAND et PETTIT, 1993, RAMZI et al, 1989, WEATHERALL, 1995, LUKENS & LEE, 1998, HARFORD et al, 1994).

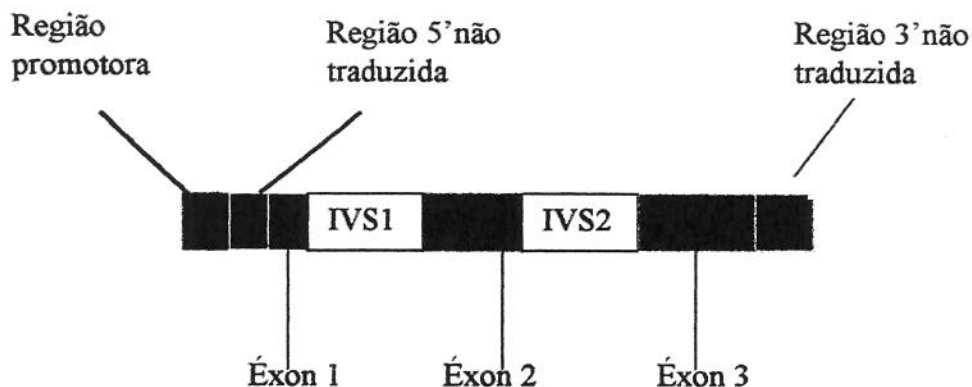


Figura 4: Estrutura dos genes da globina. Cada gene humano contém 3 éxons separados por 2 íntrons ou seqüência intermediária. No gene da globina- β , o éxon 1 codifica os aminoácidos 1 a 30, o éxon 2 os aminoácidos 31 a 140 e o éxon 3 os aminoácidos 105 a 146. As regiões 5'e 3' são regiões não traduzidas mas transcritas. A região promotora contém aproximadamente 100 pares de base algumas das quais são necessárias para a iniciação da transcrição (adaptado de LUKENS & LEE, 1998).

1.4. β TALASSEMIA – FISIOPATOLOGIA

A anemia da β talassemia apresenta três grandes componentes: 1) eritropiese ineficaz ; 2) hemólise de hemácias maduras contendo inclusões de cadeias α ;3) redução da síntese de hemoglobina, resultando na produção de células hipocrômicas e microcíticas. (WEATHERALL, 1995).

Dois fatores contribuem para a patogenia da anemia na β talassemia. A *menor síntese das cadeias de globina β* leva à formação inadequada de Hb A, de tal forma que a concentração total de Hb nas células (CHCM) é menor e as células são hipocrômicas. O segundo fator seria decorrente dos efeitos do *desequilíbrio entre a síntese das globinas α e β* . Como a síntese das cadeias de globina α permanece inalterada, grande parte das cadeias produzidas não conseguem encontrar cadeias β complementares para se coligar. As cadeias α livres formam agregados altamente instáveis que se precipitam dentro dos precursores

eritróides, na forma de inclusões insolúveis. Ocorre lesão da membrana celular levando à perda de K^+ , com comprometimento da síntese de DNA. O efeito final é a destruição das hemácias dentro da medula óssea (eritropoiese ineficaz). As hemácias que contêm inclusões e escapam da morte intramedular, ficam sob risco de destruição no baço, onde os macrófagos tentam arrancar as inclusões, causando lesão na membrana celular. Essas hemácias são eventualmente fagocitadas pelos macrófagos esplênicos, levando a um estado hemolítico com encurtamento da sobrevivência dos eritrócitos (RAMZI et al, 1989, HOFFBRAND & PETTIT, 1995, LUKENS, 1998).

Cerca de 3% da população mundial é portadora de genes para β talassemia. Estes genes são particularmente prevalentes em habitantes da Itália e Grécia (KATTAMIS et al, 1990). As maiores prevalências do estado portador, foram encontradas na Sardenha (11 a 34%), na região do delta do rio Pó, perto de Ferrara (20%), e na Sicília (10%). Na Grécia, a prevalência varia consideravelmente, oscilando desde menos de 5% até perto de 15% nas áreas meridional e central, do mesmo modo que em Chipre. A β talassemia foi descrita em judeus hindus e do Curdistão, em árabes, paquistaneses e hindus. Embora bem documentada no sudeste da Ásia e na China Meridional, a β talassemia é menos freqüente nestas regiões. Na América do Norte, a β talassemia é observada principalmente em indivíduos de descendência italiana e grega, e em negros. Na Jamaica a β talassemia pode ter sua origem tanto nas populações de imigrantes negros quanto orientais. Esporadicamente a β talassemia tem sido encontrada no norte europeu. Com a imigração e a mudança de padrões matrimoniais entre grupos étnicos, e a diferença no crescimento relativo da população, houve uma alteração na distribuição e prevalência da β talassemia. (LUKENS, 1998)

No Brasil, segundo dados de SONATI et al (1996), as hemoglobinopatias refletem a diversidade das origens raciais e os diferentes graus de mistura entre brasileiros de cada região do país. Esse estudo realizado no sudeste brasileiro, mostrou haver grande freqüência da β talassemia heterozigota (36,4% de todas as hemoglobinopatias detectadas), onde a maioria desses pacientes eram de descendência italiana e apenas 5 dos 1492 casos eram de descendentes de origem africana.

A classificação das β talassemias baseia-se na gravidade da anemia, que por sua vez baseia-se no tipo do defeito genético, bem como do modo de apresentação: homo ou heterozigote.

- A β *talassemia homozigota*, também conhecida como *talassemia maior ou anemia de Cooley*, pode resultar da supressão total (β^0) ou parcial (β^+) das cadeias de globina. Na forma β^+ a quantidade de RNAm para β -globina nos reticulócitos e nos normoblastos da medula encontra-se reduzida em três a dez vezes. Em pacientes com talassemia homozigota na forma β^0 , inexistente a síntese de β globina (LUKENS, 1998). O curso clínico na maioria dos homozigotos é grave. Ao nascimento a anemia não é evidente, e a análise do esfregaço de sangue periférico mostra, ocasionalmente, algumas células hipocrômicas. O diagnóstico pode ser estabelecido por estudo das cadeias de globina. Após alguns meses há o desenvolvimento da anemia que se torna mais grave progressivamente, exigindo repetidas transfusões sanguíneas (WEATHERALL, 1995). Resumidamente, o quadro clínico caracteriza-se por esplenomegalia, expansão óssea devido à hiperplasia da medula e manifestações decorrentes da sobrecarga de ferro devido às repetidas transfusões sanguíneas (HOFFBRAND & PETTIT, 1995). O hiperesplenismo secundário pode causar trombocitopenia, leucopenia e destruição das células transfundidas, exigindo por vezes a esplenectomia. A sobrecarga de ferro e suas repercussões são a maior causa de morbidade e mortalidade, causando danos no coração, fígado, pâncreas e outros órgãos. Na ausência de transfusões a anemia é grave e no sangue periférico, as células mostram intensas hipocromia, microcitose, anisocitose, poiquilocitose, policromatofilia e hemácias com granulações basófilas. A reticulocitose é comum, podendo não ser muito alta, quando há destruição de precursores eritróides na medula óssea. A medula óssea é hiperplásica com hiperplasia eritróide. Níveis elevados de bilirrubina, evidenciam a presença de hemólise. A eletroforese de hemoglobina revela ausência total ou quase total de Hb A, enquanto a HbA2 é variável. A Hb F está usualmente elevada, podendo representar 10 a 90% da hemoglobina total do paciente (BUNN & FORGET, 1986, HOFFBRAND & PETTIT, 1995).

- *β talassemia intermédia*: é uma variante clínica, caracterizada por grau intermediário de gravidade, entre o assintomático heterozigoto e o homozigoto dependente de transfusão sangüínea. Os quadro clínico e laboratorial são bastante variados, dependendo dos defeitos e das interações genéticas existentes (LUKENS, 1998). Em geral o termo talassemia intermédia é utilizado para descrever casos de homozigoze ou dupla heterozigoze da *β* talassemia onde a anemia não é tão grave a ponto de necessitar transfusões sangüíneas regulares. O termo tem sido também usado para descrever casos de *β* talassemia heterozigota grave onde há evidente formação de inclusões nas hemácias e conseqüente hemólise (BUNN & FORGET, 1986). Na anemia grave os níveis de hemoglobina ficam entre 5 e 7 g/dl, e o desenvolvimento da criança não é normal, apresentando características semelhantes à talassemia maior. Entretanto, alguns pacientes podem apresentar sintomatologia leve, com níveis de hemoglobina entre 8 e 12 g/dl. Esses pacientes podem desenvolver algumas complicações como: esplenomegalia e hiperesplenismo, sobrecarga de ferro, artrite, úlceras, além de apresentar maior susceptibilidade a infecções. O esfregaço sangüíneo é similar ao da talassemia maior, apresentado anisocitose significativa, hipocromia, células em alvo, granulações basófilas e numerosas formas nucleadas. A hiperplasia da medula óssea é significativa. O padrão eletroforético das hemoglobinas é variável (LUKENS, 1998).

- *β talassemia menor ou traço talassêmico*: Caracteriza-se pela presença de um gene normal e outro alterado, levando à uma síntese praticamente normal das cadeias de globina *β*, de tal modo que os indivíduos afetados são assintomáticos ou podem apresentar uma discreta anemia. A síndrome quase sempre é desvendada acidentalmente, durante a realização de exame hematológico, ou para caracterizar a anemia em um membro da família. As mulheres grávidas afetadas ficam mais anêmicas que as mulheres normais. A anemia é leve, ou inexistente, os valores de hemoglobina estão normalmente entre 9 e 11 g/dl, HCM entre 20 e 22 pg e VCM com valores de 50 a 70 fL. A medula óssea mostra leve hiperplasia eritróide com raras inclusões nas células vermelhas. Há um leve grau de eritropoiese inefetiva, mas a sobrevivência das células vermelhas é praticamente normal. O nível de hemoglobina A₂ está elevada com níveis entre 3,5 a 7%, enquanto o nível de hemoglobina fetal está elevado em cerca da metade dos pacientes, com valores entre 1 e 3%

e raramente maiores que 5%. Havendo coexistência de anemia ferropriva, o nível de HbA2 pode apresentar-se diminuído (LUKENS, 1998).

A contagem de reticulócitos, percentual e absoluta está significativamente aumentada nos β talassêmicos heterozigotos, quando comparada com indivíduos normais (PATERAKIS et al, 1991). Os níveis de ferritina estão normais ou moderadamente aumentados, e os níveis de receptor de transferrina no soro estão significativamente mais altos que nos indivíduos normais (GIMFERRER et al, 1997).

O diagnóstico diferencial entre deficiência de ferro e β talassemia heterozigota pode ser difícil. Entretanto, alguns dados laboratoriais podem auxiliar nesta distinção. Assim, na β talassemia heterozigota o VCM tende a ser menor do que na deficiência de ferro. Da mesma maneira, o RDW tende a mostrar um comportamento distinto na β talassemia heterozigota e anemia ferropriva. A microcitose, originada durante a deficiência de ferro produz uma população de hemácias mais heterogêneas do que a observada na β talassemia heterozigota. Assim os valores de RDW apresentam-se mais elevados na ferropenia do que na hemoglobinopatia (LIMA et al, 1996, GROTTTO et al, 1994). Esses achados são úteis, mas o diagnóstico preciso requer eletroforese de hemoglobina e medidas do estado do ferro. A avaliação da quantidade de ferro na medula pode ser necessária para identificar indivíduos com β talassemia heterozigota, com concomitante deficiência de ferro, situação mais comum em crianças e durante a gravidez. (BUNN & FORGET, 1986).

Os objetivos desse trabalho foram, estudar o comportamento dos reticulócitos e de suas frações de maturidade na anemia ferropriva e β talassemia heterozigota. Além disso, através de análises laboratoriais relacionadas ao metabolismo do ferro, estudar a utilidade clínica de diversos parâmetros laboratoriais, que pudessem auxiliar no diagnóstico entre as duas anemias microcíticas.



2. CAPÍTULO 1

**Clinical Use of Soluble Transferrin Receptor and Reticulocyte related
Parameters to Distinguish Beta Thalassemia Heterozigous From Iron
Deficiency Anemia**

(Submetido ao periódico: *Scandinavian Journal of Clinica and Laboratory
Investigation*)

Helena Z W Grotto
Departamento de Patologia Clínica
Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP
Caixa Postal 6111, CEP 13083-970
Campinas, SP, Brasil

14.11.2000

Dear Author(s),

We acknowledge receipt of your manuscript entitled:

Clinical use of soluble transferrin receptor and reticulocyte related parameters to distinguish beta thalassemia heterozygous from iron deficiency anemia.

The paper has been given the number **5250**, which should be quoted in all future correspondence. The manuscript will be forwarded to one of the Editors for evaluation.

Sincerely


Gaut Gadeholt
Editorial Secretary

ABSTRACT

The soluble form of transferrin receptor (sTfR) has been pointed as a useful parameter to assess the iron status and erythropoiesis activity. Immature reticulocytes present high sTfR concentration. We tested the correlation between sTfR and reticulocyte parameters in iron deficiency anemia (IDA) and β thalassemia heterozygous (β thal hetero) patients. Laboratorial parameters related to iron status and reticulocytes were studied in order to establish the clinical use of them to distinguish both anemias. Reticulocyte measurements were obtained using a semi-automated analyzer and serum concentration of sTfR was determined by an immunoenzymatic technique. Forty-nine IDA and 43 β thal hetero patients were studied. Reticulocyte count and sTfR values were significantly higher in IDA than in β thal hetero group, but the better parameter to distinguish both anemias was sTfR index, obtained by the ratio sTfR/ferritin level. Transport compartment was better evaluated by transferrin than transferrin iron binding capacity (TIBC) determinations. The association of serum iron with transferrin measurements (transferrin index) improved the accuracy of the transferrin test. The correlation between high immature reticulocytes and sTfR level was observed only in IDA group, suggesting that cellular iron deprivation is the main responsible factor for the sTfR synthesis stimulation in immature red blood cells. High sTfR values in β thal hetero patients reflect a degree of ineffective erythropoiesis in this hemoglobinopathy. We concluded that sTfR, ferritin and transferrin measurements are useful and precise parameters to discriminate IDA from β thal hetero patients.

Key words: anemia diagnosis, iron metabolism, microcytosis, reticulocyte fractions.

INTRODUCTION

New and reliable laboratorial measurements of iron status have been used for detecting and assessing different stages of iron deficiency. Furthermore, there is also a consensus that iron status should be interpreted using a group of parameters and not only one single test. It is also pertinent to consider costs and time spent to achieve a correct diagnosis.

Some authors have suggested the use of reticulocyte parameters to distinguish iron deficiency anemia (IDA) from β thalassemia heterozygous (β thal hetero) (1), both presenting hypochromia and microcytosis of erythrocytes and both with a high incidence in Brazil (2). The clinical value of the reticulocyte quantitation was renewed by the automation of the reticulocyte count plus the possibility of determining the immaturity of reticulocyte population as erythropoiesis activity analysis (3). Yoldi et al (1) evaluated samples from β thal hetero and IDA using flux cytometry, and it was established that a value $< 2\%$ for high fluorescent reticulocytes (HFR) would be used as discriminate value between these pathologies. Reticulocytes present membrane transferrin receptor with a higher concentration in more immature cells. The soluble form of transferrin receptor (sTfR) was first described by Kohgo et al (4) and corresponds to a truncated form lacking the cytoplasm and transmembrane domains of intact receptor (5). The sTfR determination has been pointed as a useful parameter to assess the iron status and erythropoiesis activity (6).

The objective of this study is to test laboratorial parameters related to reticulocytes and sTfR determinations, in order to determine their use to distinguish β thal hetero from IDA.

MATERIAL AND METHODS

Subjects: a group of adult patients (n=92) with hypochromic and microcytic anemia was studied. IDA (n=49) was defined as serum ferritin (SF) level below 30 ng/mL for men and 12 ng/mL for women (7). Patients with SF levels higher than the above mentioned and Hb A₂ level higher than 3.4 % were considered as β thal hetero (n=43). Fifty-seven nonanemic subjects were used as controls.

Methods: hematological measurements including reticulocyte parameters were obtained using a Cell Dyn 3500 (Abbott- USA) analyzer. Reticulocyte is identified by a non-fluorescent method using New methylene blue as dye. Fractions of reticulocyte maturity are calculated depending on the absorption intensity and they are classified as: mature, midmature and high immature reticulocytes fractions.

Hemoglobin A₂ was quantified spectrophotometrically after cellulose acetate electrophoresis (8).

Determination of iron status: determination of serum iron (SI) and the transferrin iron binding capacity (TIBC) were done with a Mira Plus Cobas analyzer (Roche – Switzerland) using Unimate 5 Iron and Unimate 7 UIBC kits (Roche Diagnostic Systems – Switzerland). SF was determined by a chemiluminescence system (kit Immulite – Diagnostic Products Co. – USA)

Transferrin concentration (TFR) was quantified by nephelometric method (Beckman – Ireland). The serum concentration of sTfR was measured by an immunoenzymatic technique (Quantikine – R&D Systems – USA).

Statistical analysis: In order to compare the variables between the groups, the Kruskal-Wallis test was employed. The Spearman correlation coefficient test was used for assessing the association between variables, with level of significance set at < 0.05 . The capacity of the tests to discriminate between the groups was studied by means of ROC curves that defined the optimal decision limit of each parameter and the accuracy of each method. The protocol of this study was approved by the Committee of Ethics of the School of Medical Sciences, University of Campinas, São Paulo, Brazil.

RESULTS

The distribution of laboratorial values among the patients and control groups are shown in Table I. Two indicators, TI and sTfRI, were included, obtained by the ratio SI/TRF and by the ratio sTfR/SF, respectively (9, 10). Comparing the variables between groups, it was observed a significant difference between normal and β thal hetero, normal and IDA and β thal hetero and IDA concerning to reticulocyte counting and sTfR values ($p=0.0001$). TFR, TI and sTfRI were significantly different between IDA and β thal hetero and also between IDA and control groups ($p=0.0001$).

The correlation between HFR and sTfR was significant ($p=0.025$) only in IDA group. Transferrin saturation (TS) and TI indices measure iron transport compartment and the correlation coefficients were positive in all groups (Table II). However, TI was more accurate than TS to distinguish IDA from β thal hetero, with 100% of specificity for TI (Table III and Figure 1). Two of 41 IDA patients showed $TI > 0.17$: one of them showed TRF concentration below normal limit and the other one presented normal SI level. The latter one was iron depleted (low ferritin level), although SI concentration was normal. Comparing TIBC and TRF accuracies, we could observe that TRF had a better performance than TIBC to recognize IDA patients (Table III). Four IDA patients showed TRF values lower than 278.0 mg/dl. Three of them could be identified as IDA by TI value. The other one presented TRF concentration below normal limit and sTfRI compatible with IDA. It was not investigate if the patient had some associated clinical condition that could explain a decreasing synthesis or lost of TRF. Ten of the 43 β thal hetero patients present TIBC values higher than the superior normal limit. One of them showed results compatible with iron deficiency, although ferritin level was normal ($SF = 27 \mu\text{g/L}$). Transferrin saturation, sTfR and sTfRI values (10%, 72 nmol/L and 270, respectively) indicated an iron depletion, but TRF concentration, contrary to expected, showed normal values (212 $\mu\text{g/dL}$). The second patient was firstly classified as β thal hetero, according to hematological values, HbA_2 and ferritin determinations. However, the film examination revealed nucleated blood red cells, punctuate basophilic, poikilocytes and cell fragments. In fact, clinical features suggest that this individual is β thalassemic intermedia patient. Medical records reported a

splenectomy when the patient was 7 years old and repetitive transfusion proceedings from 7 to 22 years old, due to anemia. Nowadays the patient presents an associated chronic liver disease. The high TIBC value (476 $\mu\text{g/dL}$), low transferrin saturation and serum iron determinations suggest an associated iron deficiency anemia, which diagnosis has been reinforced by an elevated sTfR value (41 nmol/L). The other eight patients do not present additional laboratorial results that could explain high TIBC values. sTfR measurement showed an accuracy of 0.876 (Figure 2) and this result was improved by the ratio sTfR/I (accuracy=0.997) (Figure 3). Only one IDA and one β thal hetero showed values out of limits, providing 97.6% sensitivity and 97.2% specificity for the parameter.

DISCUSSION

Transferrin receptors are membrane glycoproteins responsible for binding transferrin during the endocytosis of iron. The density of surface transferrin receptor is proportional to the iron requirement of the cell. Then, the transferrin is abundant in cells of organs with the highest iron requirements, such as the erythron marrow and the placenta. After internalization by endocytosis, the endosome containing the transferrin-receptor complex becomes acidified and iron loses its affinity for transferrin. Receptor and transferrin return to the cell surface, where the transferrin is released while the iron is transported to the cytosol (11). The initial study about circulating transferrin receptor was reported by Kohgo et al (4). They demonstrated that the concentration of this protein was significantly elevated in enhanced erythropoiesis and iron deficiency. The clinical use of the sTfR has been reported in several situations, especially to distinguish iron deficiency from the hypoproliferative anemia that is associated with chronic diseases (12). The serum receptor increases with the severity of the iron deficiency anemia, but not in chronic diseases. In addition, sTfR provides an assessing of erythropoiesis status, because an increase in the sTfR concentration is proportional to the expansion of the erythroid marrow (13). In hemolytic anemias with efficient erythropoiesis there is a close parallel rise in sTfR and absolute reticulocyte count (11). On the other hand, in disorders in which there is an ineffective erythropoiesis, such as myelodysplasia, an increase in sTfR is observed,

whereas the reticulocyte count changes little (14). Patients with β thal hetero have increased erythroid marrow activity, although they present various degrees of an ineffective erythropoiesis (15).

The association of the sTfR and the serum ferritin by the sTfR/ferritin index has been indicated as a helpful parameter to identify patients with iron deficiency and to distinguish those with iron deficiency from β thal hetero (16). Gineffer et al (17) studied 35 β thal hetero and 10 β thal hetero associated to IDA and observed that sTfR was significantly higher in β thal hetero than in normal controls, but significantly lower than in IDA. sTfR was not useful in diagnosing associated IDA in β thal hetero patients.

In our study we tested parameters related to sTfR, transferrin and reticulocyte counts in patients with IDA and β thal hetero. Reticulocytes are good indicators of erythropoiesis activity. Automated methods using flow cytometry and RNA dyes resurrected the confidence in reticulocyte counts and introduced new approaches concerning bone marrow response by the quantification of reticulocyte maturity (18). Thus, immature reticulocyte fraction has been reported as an early predictor of the regenerative activity of bone marrow after bone marrow transplantation (19, 20).

Yoldi et al (1) described high fluorescent reticulocytes as a good discriminant between β thal hetero and IDA, since the value in IDA is higher than in β thal hetero. Such difference has not been found in our study. An explanation for that fact could be that the used methodology has not included fluorescence to identify reticulocyte maturity. However, we carried out a similar study using flow cytometry and thiazole orange as dye and the results did not change (HFR= 5.11 ± 4.47 to β thal hetero and HFR= 4.39 ± 4.55 to IDA, $p > 0.05$ - data not published). It has been reported that reticulocytes in iron deficiency states may contain increased amounts of transferrin receptor (21). Then, it was expected a positive correlation between sTfR and HFR. We observed a modest but significant correlation between these parameters in IDA, but not in β thal hetero. Iron deficiency causes an increase in the rate of transferrin receptor production, due to both increased synthesis and increased stability of transferrin receptor mRNA (22). Iron deficient rats showed receptor density 74% over the normal rats in function of an increasing

in erythroid cells population and an increase in transferrin receptor on the individual cell (23). We tested the diagnostic use of sTfR for IDA and we could determine a value where the test presents sensibility of 100% and specificity of 69.4% in distinguish IDA from β thal hetero. The specificity increased to 97.2% when sTfR value was combined with ferritin value, confirming the results reported by Cermak (16). sTfR and sTfRI detected IDA patients that could not be identified by other laboratory parameters as TIBC, TS or TFR rates, demonstrating the value of the sTfR measurement for identifying functional iron deficiency. We observed a negative correlation between sTfR and ferritin levels. Shikne et al (9) determined the sTfR changes during the evolution of iron deficiency in a phlebotomy program. They demonstrated that there was a progressive elevation in sTfR when serum ferritin fell below the normal range. Before this stage there was no significant change in sTfR levels. All of our patients had serum ferritin below the normal range and due to this fact we could observe an inverse correlation between sTfR and ferritin. In the phlebotomy study (9) the mean sTfR/ferritin ratio was 100 at baseline stage and a ratio of 500 identified the point at which iron stores were fully exhausted. Our minimum sTfR/ferritin ratio value was 110.0. Up to 140.0 β thal hetero patients could be identified.

Plasma iron transport is made by transferrin, a monomeric glycoprotein that binds two atoms of Fe^{3+} with high affinity (24). The TIBC is a measurement of transferrin concentration and was described by Ramsay forty years ago. Despite TIBC is indispensable for determining iron status, technical problems found by Bill Ramsay has not been solved until now (25,26). An alternative approach would be measuring transferrin directly by immunological assay. In our study the nephelometry was used to measure the concentration of transferrin which showed to be a more accurate method than TIBC. It has also the advantages of requiring a small sample and being nonsusceptible to iron contamination (27). We could notice the apparent limitation of TIBC estimation when some of β thal hetero patients showed high TIBC values although transferrin determination was normal. Probably a spuriously high value was due to a non-transferrin iron measurement (28).

We could conclude that the interpretation of iron status, is based in a group of laboratorial findings and, according to our results, the association of sTfR and ferritin measurements is more precise to distinguish β thal hetero from IDA. However, in a

We could conclude that the interpretation of iron status, is based in a group of laboratorial findings and, according to our results, the association of sTfR and ferritin measurements is more precise to distinguish β thal hetero from IDA. However, in a screening survey where it is pertinent to consider costs, transferrin evaluation may be adopted, since it showed a good performance to discriminate both microcytic hypochromic anemias.

Acknowledgments: This work was supported by “Fundo de apoio ao ensino e à pesquisa”, from UNICAMP (FAEP 1123/97).

REFERENCES

1. Yoldi F, Deblas UM, Alvarez D, Alonso D, Rivera F, Rodriguez UM. Automatizacion del recuento de reticulócitos. *Sangre* 1991;33:219-22.
2. Sonati MF, Kimura EM, Grotto HZW, Gervasio AS. Hereditary hemoglobinopathies in a population from southest Brazil. *Hemoglobin* 1996; 20(2):175-79.
3. Corberand JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 1996; 38:487-94.
4. Kohgo Y, Nishisato T, Kondo H, et al. Circulating transferrin receptor in human serum. *Brit J Haematol* 1986; 64:277-281.
5. Cook JD, Skikne BS, Baynes RD. Serum transferrin receptor. *Ann Rev Med* 1993;44:63-74.
6. Beguin Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. *Haematologica* 1992;77:1-10.
7. Mast AE, Blinder MA, Gronowski NA, Chumley C, Scott MG. Clinical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with seum ferritin in several populations. *Clin Chem* 1998; 44 (1): 45-51.

9. Skikne BS, Flowers CH, Cook JD. Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. *Blood* 1990;75:1870-76.
10. Beiby J, Olynyk, Shing S, et al. Transferrin index: an alternative method for calculating the saturation of transferrin. *Clin Chem* 1992;38:2078-81.
11. Cook JD, The measurement of serum transferrin receptor. *Am J Med Sci* 1999;318(4):269-76.
12. Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, et al. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992;119:385-90.
13. Huebers HA, Beguin Y, Pootrakul P, et al. Intact transferrin receptors in human plasma and their relation to erythropoiesis. *Blood* 1990;75:102-7.
14. Bowen DT, Culligan D, Beguin T, et al. Estimation of effective and total erythropoiesis in myelodysplasia using serum transferrin receptor and erythropoietin concentrations, with automated reticulocyte parameters. *Leukemia* 1994;8:151-5.
15. Centis F, Delfini C, Agostinelli F, et al. Soluble transferrin receptor following bone marrow transplantation from donors heterozygous for beta thalassemia. *Haematologica* 1994;79:448-51.
16. Cermak J, Brabec V. Transferrin receptor-ferritin index: a useful parameter in differential diagnosis of iron deficiency and hyperplastic erythropoiesis. *Eur J Haematol* 1998;61:210-12.
17. Gimferrer E, Ubeda J, Remacha AF. Serum transferrin receptor level are "physiologically" high in heterozygous β -thalassemia. *Haematologica* 1997;82:728-34.
18. Rowan RM, Cavill I, Corberand JX. The reticulocyte count: progress toward the resurrection of a useful clinical test. *Clin Lab Haem* 1996;18:3-8.

19. Grotto HZW, Vigoritto AC, Noronha JFA, Lima GAFM. Immature reticulocyte fraction as a criterion for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte counting method. *Clin Lab Haem* 1999;21:285-87.
20. Corberand JX. Reticulocyte analysis using flow cytometry. *Hematol Cell Ther* 1996;38:487-94.
21. Rouault T, Rao K, Harford J, Mattia E, Klausner R. Hemin, chelatable iron and the regulation of transferrin receptor biosynthesis. *J Biol Chem* 1985;260:14862-66.
22. Mullner EW, Kuhn LC. A stem-loop in 3' untranslated region mediates iron-dependent regulation of transferrin receptor mRNA stability in cytoplasm. *Cell* 1988;53:815-25.
23. Intragumtornchai T, Huebers HA, Eng M, Finch CA. In vivo transferrin-iron receptor relationships in erythron of rats. *Am J Physiol* 1988;255:R236-31.
24. Workwood M. Influence of disease on iron status. *Proc Nutr Soc* 1997;56:409-19.
25. Workwood M. The laboratory assessment of iron status: an update. *Clin Chim Acta* 1997;259:3-23.
26. Fairbanks VF. Laboratory testing for iron status. *Pract off ed* 1991;26(3):17-24.
27. Woo J, Henry JB. Metabolic intermediates and inorganic ions. In: Henry JB, ed. *Clinical diagnosis methods*. Philadelphia: WB. Saunders Company, 1996:190-91.
28. Workwood M. Iron deficiency anaemia. In: Dacie JV & Lewis SM, ed. *Practical Haematology*. London. Churchill Livingstone, 1995: 437-44.

TABLE I: Hematological and iron parameters in different groups of patients and control. Values are means \pm SD and range.

PARAMETERS	GROUPS		
	control (n=57)	β thal hetero (n=41)	IDA (n=50)
RTC	67.9 \pm 17.6	160.19 \pm 137.8	93.7 \pm 52.43
(x 10 ⁶ /L)	(28.8-134.0)	(64-808)	(31.0-305.0)
HFR	6.2 \pm 2.9	7.33 \pm 3.74	6.96 \pm 3.55
(%)	(2.9-18.9)	(6.6-23.6)	(1.9-21.2)
SI	96.7 \pm 29.3	86.8 \pm 29.7	26.6 \pm 17.45
(μ g/dL)	(42.0-149.0)	(24.0-163.0)	(2.0-76.0)
TIBC	352.4 \pm 58.5	402.9 \pm 99.9	409.1 \pm 105.8
(μ g/dL)	(245.0-467.0)	(264.0-689.0)	(210.0-630.0)
TS	28.0 \pm 11.0	24.0 \pm 12.0	8.0 \pm 9.0
(%)	(12.0-60.0)	(10.0-60.0)	(1.0-6.0)
SF	103.8 \pm 72.4	142.24 \pm 156.2	7.4 \pm 4.75
(ng/mL)	(17.7-334.0)	(24.0-682.0)	(1.5-23.5)
TRF	249.8 \pm 28.7	231.1 \pm 55.7	337.5 \pm 61.3
(mg/dL)	(202.0-317.0)	(125.0-366.0)	(111.0-427.0)
TI	0.41 \pm 0.11	0.39 \pm 0.15	0.08 \pm 0.05
	(0.20-0.65)	(0.18-0.76)	(0.01-0.26)
sTfR	16.88 \pm 3.1	27.1 \pm 15.82	50.26 \pm 21.4
(nmol/L)	(12.5-27)	(15.0-91.0)	(23.5-108.5)
sTfRI	27.7 \pm 23.60	46.51 \pm 48.92	1287.5 \pm 1329.2
	(5.2-99.4)	(3.0-279)	(119.0-5812.0)

Rtc: reticulocyte count; HFR: high immature reticulocyte fraction; SI: serum iron; TIBC: transferrin iron binding capacity; TS: transferrin saturation; SF: serum ferritin; TRF: serum transferrin; TI: transferrin index = SI/TRF; sTfR: soluble transferrin receptor; sTfRI: sTfR index = sTfR/SF.

TABLE II: Correlation between variables in patients with β thal hetero, IDA and controls.

VARIABLES	GROUPS		
	CONTROL	β THAL HETERO	IDA
HFR X sTfR	r = 0.049 p = 0.795	r = 0.007 p = 0.963	r = 0.349 p = 0.025
sTfRI X SI	r = - 0.081 p = 0.670	r = 0.087 p = 0.611	r = - 0.140 p = 0.381
TS X TI	r = 0.904 p = 0.0001	r = 0.628 p = 0.0001	r = 0.675 p = 0.0001
TIBC X TRF	r = 0.688 p = 0.0001	r = 0.169 p = 0.322	r = 0.517 p = 0.0005
sTfR X SF	r = 0.178 p = 0.345	r = 0.0117 p = 0.945	r = - 0.384 p = 0.013
sTfR X Rtc	r = 0.262 p = 0.1615	r = 0.2883 p = 0.0881	r = 0.170 p = 0.286
sTfR X Hb	r = 0.121 p = 0.523	r = -0.4249 p = 0.0098	r = -0.1117 p = 0.4867

Hb: hemoglobin (g/dL)

TABLE III: Accuracy, sensitivity, specificity and cutoff values to distinguish IDA from β thal hetero (ROC curve results).

PARAMETER	ACCURACY (%)	SENSITIVITY (%)	SPECIFICITY (%)	DECISION LIMIT
Rtc	0.762	68.0	74.4	$\leq 93 \times 10^6/L$
HFR	0.541	82.0	30.2	$\leq 8.3\%$
TIBC	0.536	60.0	62.8	$\geq 401 \mu g/dL$
TS	0.942	84.0	95.3	$\leq 10 \%$
TI	0.992	95.1	100	≤ 0.17
TRF	0.901	87.8	88.9	$\geq 278 \text{ mg/dL}$
sTfR	0.876	100	69.4	$\geq 23 \text{ nmol/L}$
sTfRI	0.997	97.6	97.2	≥ 140

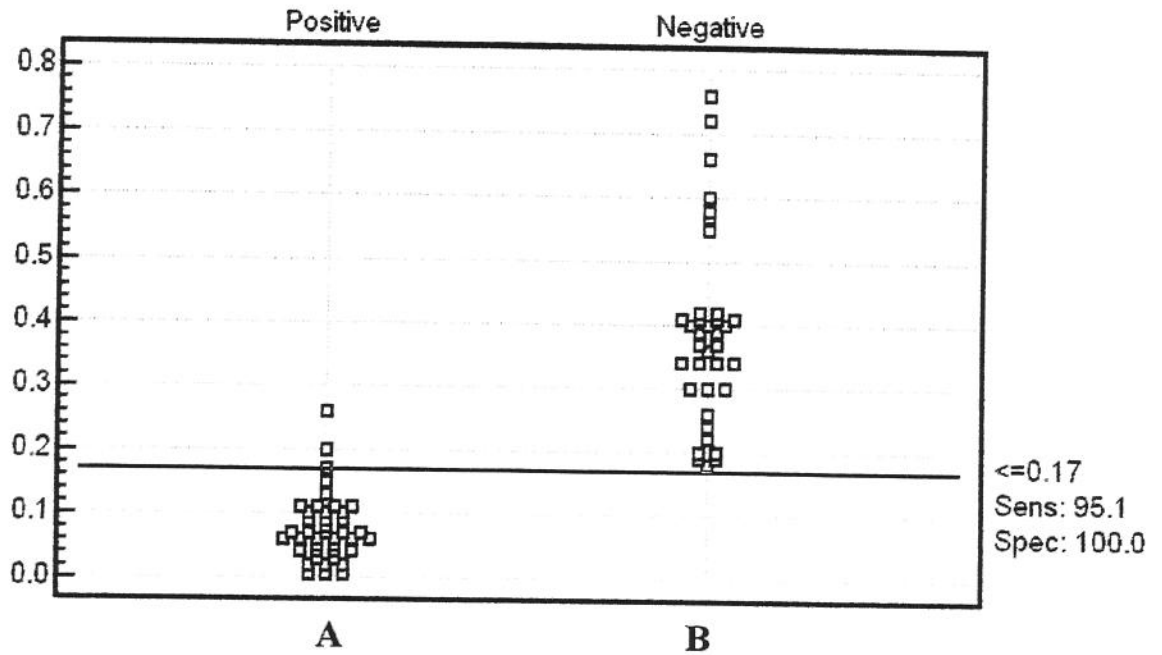


Figure 1: Transferrin index (SI/TRF) in IDA (group A n= 41) and β thal hetero (group B n= 35). The discrimination limit is set at 0.17.

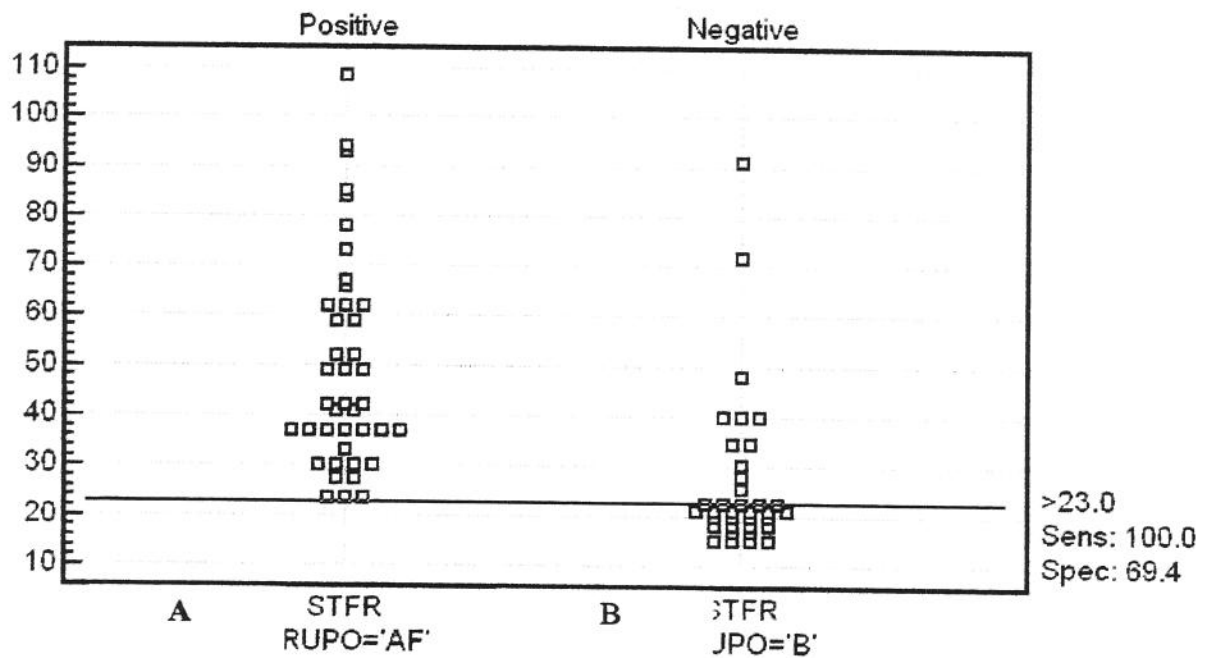


Figure2: sTfR in IDA (group A n=41) and B thal hetero (group B n=35). The discrimination limit is set at 23.0 nmol/L.

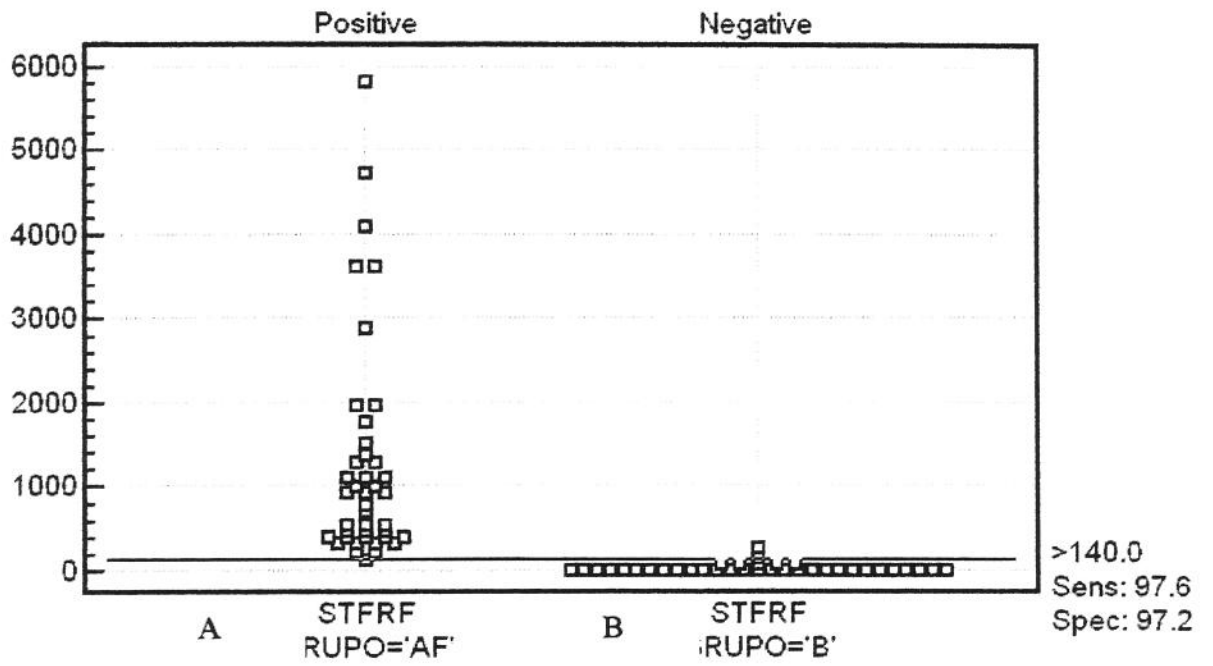


Figure 3: sTFRI index in IDA (group A n=41) and β thal hetero (group B n=35). The discrimination limit is set at 140.0.

3. DISCUSSÃO

PONKA & LOK (1999), em uma valiosa revisão sobre o receptor da transferrina, enfatizaram a importância de novas descobertas a nível químico, funcional e molecular desse interessante receptor. É curioso saber, por exemplo, que a transferrina foi identificada nos insetos, o que comprova a sua existência em seres muito primitivos dentro da escala evolutiva. O receptor da transferrina, por outro lado, foi identificado na alga unicelular *Dunaliella saliva*.

Dentro do estudo do metabolismo do ferro no homem, as investigações referentes ao receptor da transferrina tem caminhado rapidamente, em especial no que diz respeito à caracterização estrutural dessa glicoproteína e de algumas mutações descritas que podem interferir na atividade de ligação à transferrina (WILLIAMS & ENNS, 1991) e numa maior susceptibilidade à proteólise (RUTLEGDE et al, 1994b). Outras investigações sugerem a possível interação entre o receptor da transferrina e a proteína codificada pelo gene HFE, responsável pela hemocromatose hereditária (PARKKILA et al, 1998). Foi demonstrado que o HFE normal liga-se ao receptor da transferrina e diminui sua afinidade pela transferrina diférrica, enquanto o HFE mutado (Cys 282Tyr) não se liga ao receptor da transferrina, perpetuando a ligação da transferrina ao seu receptor e favorecendo o acúmulo de ferro (FEDER et al, 1998). Não está ainda elucidado se a ligação HFE-receptor de transferrina poderia ou não interferir na captação de ferro pela célula.

No presente trabalho estudamos o receptor da transferrina, enfatizando a sua utilidade clínica como um parâmetro laboratorial diferencial entre dois tipos de anemia microcítica: AF e β tal hetero. Associamos à ele, a análise do comportamento dos reticulócitos nas duas formas de anemia, lançando mão de novos parâmetros reticulocitários relacionados a padrões de maturidade dessas células. Sendo os reticulócitos as células representativas da série eritrocitária na circulação que ainda apresentam receptores da transferrina em sua membrana celular, pareceu-nos interessante englobar aspectos relacionados aos reticulócitos e aos receptores da transferrina numa mesma análise.

De fato, nossos resultados revelaram dados interessantes. Como era esperado, a contagem absoluta de reticulócitos foi significativamente mais elevada nos pacientes com β tal hetero. No entanto, a fração de alta imaturidade de reticulócitos, que

esperava-se que apresentasse valores distintos dos grupos normal e ferropênico, não foi observado. Dois únicos pacientes com β talassemia heterozigota mostraram valores de HFR excessivamente altos. Coincidentemente, apresentaram contagens de reticulócitos totais igualmente elevadas. Posteriormente, pudemos constatar que esses 2 pacientes, na verdade, foram erroneamente classificados: um deles tem quadro clínico e laboratorial sugestivos da forma intermediária (diagnóstico está sendo confirmado) e o segundo apresenta a β talassemia na forma homozigota.

Estudos sobre graus de maturidade dos reticulócitos em hemoglobinopatas não são muito freqüentes na literatura. KHUHAPINANT et al (1994) estudaram reticulócitos em vários tipos de talassemia, através de citometria de fluxo. Mostraram que os α talassêmicos apresentaram número de reticulócitos significativamente mais elevados que os β tal hetero não esplenectomizados, embora a maturação celular fosse similar entre os dois grupos. YOLDI et al (1991) estudaram 41 indivíduos β talassêmicos heterozigotos e 42 ferropênicos e puderam determinar um valor de HFR capaz de discriminar a maioria dos casos de β tal hetero.

Além dos diferentes graus de maturidade dos reticulócitos, alguns equipamentos permitem a avaliação do conteúdo de hemoglobina dessas células através das determinações do CHCMr e HCMr. Comparando esses valores em pacientes com anemia microcítica (AF e β tal hetero) foi observado não haver diferença na concentração de hemoglobina nos 2 grupos, embora o volume dos reticulócitos fosse menor na talassemia do que na AF (D'ONOFRIO et al, 1995).

SCHAEFER ET SCHAEFER (1999), estudando pacientes submetidos à hemodiálise e tratados com eritropoetina humana recombinante para estimular a eritropoiese, relataram que a determinação do conteúdo de Hb nos reticulócitos (CHr) é o parâmetro mais sensível para detectar a existência de eritropoiese deficiente de ferro. Esses reticulócitos pobres em conteúdo de Hb e ferro, provavelmente correspondem aos reticulócitos mais jovens recém liberados da medula, cujas células progenitoras deficientes de ferro estão sintetizando uma maior quantidade de receptores de transferrina. Isso poderia explicar a correlação entre sTfR e HFR que observamos no nosso grupo de pacientes com AF.

WELLS et al (1992), utilizaram como indicador da maturidade celular um índice conhecido como MCF ("mean channel fluorescence") e correlacionaram parâmetros hematológicos e do estado de ferro em sangue de mulheres grávidas com deficiência de ferro, em pacientes com ADC (anemia de doença crônica) e controles normais. Os níveis de MCF foram significativamente mais altos na deficiência de ferro quando comparados com os normais e com os pacientes com ADC. Houve uma correlação significativa entre MCF e TIBC e entre MCF e ferritina, sugerindo que a elevação do MCF no grupo com deprivação de ferro parece refletir um efeito do estado do ferro. Pacientes com ADC mostraram valores de MCF semelhantes aos indivíduos normais.

No nosso trabalho, não foi observada a correlação entre sTfR e HFR entre os β tal hetero. Os valores de sTfR encontrados nesse grupo, embora superiores ao grupo normal, mas significativamente inferiores ao grupo com anemia ferropriva, nos faz supor que sejam conseqüentes a um maior estímulo da eritropoiese medular. A correlação inversa entre sTfR e Hb observada no grupo β tal hetero, vem confirmar essa hipótese e sugerem que o sTfR pode ser utilizado como um indicador da resposta medular frente a um estímulo à sua expansão, no caso, baixos níveis de hemoglobina.

A determinação do sTfR, e também da eritropoetina sérica (sEPO), foi utilizada como instrumento da investigação da expansão da eritropoiese em pacientes com talassemia intermédia em dois estudos realizados na Itália. No primeiro deles (GALANELLO et al, 1994), pacientes com Hb F > 40% e, portanto, sofrendo um grande estímulo à eritropoiese devido à alta afinidade dessa Hb ao oxigênio, apresentaram níveis de sEPO e sTfR significativamente mais altos que aqueles com HbF <40%, embora com concentrações semelhantes de Hb e, conseqüentemente, graus similares de anemia. CAMASCHELLA et al (1996) conduziram trabalho semelhante ao anterior e não observaram correlação entre níveis de Hb e sEPO, assim como entre Hb e sTfR em um grupo de 30 pacientes com β talassemia intermédia. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com Hb F < 40% e > 40% em relação aos níveis de sTfR.

Na avaliação dos vários parâmetros laboratoriais como discriminantes dos dois tipos de anemia microcítica, pudemos constatar a alta eficiência e sensibilidade do sTfR em distinguir os grupos. Esses dados são concordantes com a literatura, que aponta a determinação do sTfR como indicador mais sensível à depleção funcional de ferro

(BAYNES, 1996). A associação do sTfR com a ferritina através do índice sTfRI foi o melhor parâmetro para discriminar a AF da β tal hetero. O sTfR e a ferritina avaliam estágios diferentes da depleção de ferro: durante a depleção dos estoques, as concentrações de sTfR não se alteram, enquanto a ferritina decresce progressivamente. Numa fase mais avançada de deprivação, quando a depleção atinge o compartimento funcional, o sTfR sofre alterações significativas, enquanto a ferritina permanece relativamente constante (BAYNES, 1996). Em um estudo onde foi feita a evolução dos níveis de sTfRI durante o processo de flebotomia seriada, foi possível determinar os valores do sTfRI indicativos de estoque adequado de ferro (<100) e de depleção de estoque (500) (SKIKNE et al, 1990). No nosso estudo, somente 1 paciente inicialmente diagnosticado como β tal hetero apresentou valor de sTfRI > 140 . Trata-se do mesmo paciente com β talassemia intermédia que, provavelmente, tem AF associada.

Infelizmente, até o momento, o alto custo dos reagentes para a determinação do sTfR inviabilizam o seu uso na rotina laboratorial.

Entre os exames já implantados nos laboratórios de Patologia Clínica, a porcentagem de saturação da transferrina mostrou resultados bastante satisfatórios, embora o limite de decisão tenha sido de 10%, valor inferior ao descrito na literatura (16%) como indicativo de um inadequado suprimento de ferro à eritropoiese (HOFFBRAND & PETTIT, 1995).

A quantificação da transferrina no soro foi implantada em nosso Serviço durante o desenvolvimento deste trabalho e pudemos constatar a praticidade, rapidez e alta produtividade dessa análise. As técnicas de turbidimetria e nefelometria quantificam a formação de imunocomplexos em solução de forma precisa, rápida e automatizada. Tem sido extensivamente utilizadas nos laboratórios clínicos e substituído reações mais complexas e demoradas, destinadas a quantificar proteínas, drogas e outras substâncias (RILEY, 1994).

A capacidade de ligação do ferro à transferrina (TIBC) é a análise mais corriqueiramente utilizada para se avaliar o compartimento de transporte do ferro. Esse teste mede, aproximadamente, a concentração de transferrina no soro. São apontadas algumas desvantagens metodológicas referentes à determinação do TIBC: volume de amostra requerido relativamente grande, susceptibilidade à contaminação com ferro antes e

durante a realização do teste e pouca especificidade (BANDI et al, 1985, COOK, 1992). Um outro fator limitante seria que o TIBC e o próprio ferro sérico sofrem variações em suas concentrações no decorrer do dia, podendo variar em até 100% num intervalo de 24 horas no indivíduo sadio (COOK, 1992, WORWOOD, 1997b). As concentrações de ferro sofrem, ainda, rápidas alterações quando a demanda é aumentada por condições infecciosas, inflamatórias ou cirúrgicas. Por outro lado, altas concentrações são observadas nas doenças hepáticas, anemia hipoplásicas e na eritropoiese ineficiente (WORWOOD, 1997a).

No nosso estudo pudemos observar a grande imprecisão do TIBC na discriminação dos 2 grupos de pacientes com anemia microcítica. A dosagem da transferrina demonstrou ser mais eficiente na distinção entre os grupos, alcançando um desempenho praticamente perfeito quando associada à determinação do ferro sérico através do índice TI. COOK et col (1992) descrevem a TS como um teste valioso em estudos populacionais com alta prevalência de talassemia. Relatam a TS como invariavelmente elevada na talassemia major devido à excessiva absorção de ferro, enquanto está reduzida na deficiência de ferro. Podemos acrescentar, de acordo com os nossos dados, a importância do TI na discriminação da AF da β talassemia heterozigota.

4. CONCLUSÕES GERAIS

1. Reticulócitos altamente imaturos apresentam valores semelhantes na AF e na β tal hetero, não auxiliando, portanto, no diagnóstico diferencial entre os dois tipos de anemia.
2. A determinação do sTfR mostrou ser um interessante parâmetro de análise da atividade eritropoiética e do metabolismo do ferro, apresentando valores significativamente diferentes na AF e na β tal hetero.
3. O índice sTfR/ferritina mostrou a melhor acurácia na distinção entre AF e na β tal hetero.
4. A determinação dos níveis de transferrina como medida do compartimento de transporte, revelou ser mais precisa, sensível e específica do que a determinação do TIBC. Além disso é mais rápida e prática na sua execução.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, J.; BACKSTROM, K.R.; COOPER, J.A.; COOPER, M.C.; DETWILER, T.C
ESSEX, D.W.; FRITZ, R.P. -Measurement of soluble transferrin receptor in serum
of healthy adults. **Clin Chem** ,44(1): 35-39, 1998
- BANDI, Z.L.; SCHOEN, I; BEE, D.E. - Immunochemical methods for measurement of
transferrin in serum: effects of analytical errors and inappropriate reference intervals
on diagnostic utility. **Clin Chem**, 31(10): 1605-1985, 1985.
- BAYNES, R.D.; SHIH, Y.J.; HUDSON, B.G.; COOK, J.D. - Identification of the
membrane remnants of transferrin receptor using domain specific antibodies. **J Lab
Clin Med** ,123: 407-414, 1994.
- BAYNES, R.D. - Transferrin reduces the production of soluble transferrin receptor. **Proc
Soc Exp Biol Med** ,209: 286-294, 1995.
- BAYNES, R.D. - Assessment of iron status. **Clin Biochem**, 29: 209-215, 1996.
- BAYNES, R.D.; SHIH, Y.J.; HUDSON, B.G.; COOK, J.D. - Production of the serum form
of the transferrin receptor by a cell membrane associated serine protease. **Proc Soc
Exp Biol Med**,204: 65-69, 1993.
- BEGUIN, Y. - The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as
quantitative measure of erythropoiesis. **Haematologica** ,77: 1-10, 1992.
- BRUGNARA, C. - Use of reticulocyte cellular indices in the diagnosis and treatment of
Haematological disorders. **Int J Clin Lab Res** ,28: 1-1,1998.
- BUNN, H.F. & FORGET, B.G.- **Hemoglobin: Molecular, Genetic and Clinical Aspects.**
Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1986.
- CAMASHELLA, C.; GONELLA, S.; CALABRESE, R.; VISCIA, F.; ROETTO, A.;
GRAZIADEI, G.; MAZZA, U.; CAPPELLINI, M.D. - Serum erythropoietin and
circulating transferrin receptor in thalassemia intermedia patients with heterogeneous
genotypes. **Haematologica**, 81: 397-403, 1996.

- CARRIAGA, M.T.; SKIKNE, B.S.; FINLEY, B.; CUTLER, B.; COOK, J.D. - Serum transferrin receptor for the detection of iron deficiency in pregnancy. **Am J Clin Nutr**, **54**: 1077-1081, 1991.
- COOK, J.D.; BAYNES, R.D.; SKIKNE, S.B. - Iron deficiency and the measurement of iron status. - **Nutr Res Rev**, **5**: 189-202, 1992.
- COOK, J.D.; SKIKNE, B.S.; BAYNES, R.D. - Serum Transferrin Receptor. **Ann Rev Med**, 63-74, 1993.
- COOK, J. - The measurement of serum transferrin receptor. **Am J Med Sci**, **318(4)**: 269-276, 1999
- CORBERAND, J.X. - Reticulocyte analysis using flow cytometry. **Hematol Cell Ther**, **38**: 487-494, 1996.
- DALAL, B.I.; STTOCKFORD, G.R.; NAIMAN, S.C.; POYNTON, C.H. ; WHITTAKER, J.A. - Criteria for marrow engraftment: comparasion of reticulocyte maturity index with conventional parameters. **Bone Marrow Transplant**, **17**: 91-92, 1996.
- DI GREGORIO, F.; PIZZARELLI, G.; PASSERO, E.; CANNELLA, A.; LEONARDI, C. - La microcitosi. **Minerva Pediatr**, **50**: 23-37, 1998.
- D'ONOFRIO, G.; CHIRILLO, R.; CAENARO, G.; TOMMASI, M.; MICCIULLI, G. - Simultaneous measurement of reticulocyte and red blood cell indices in health subjects and patients with microcytic and macrocytic anemia. **Blood**, **85**:818-823, 1995.
- ELGHETANY, M.T. & DAVEY, F.R. -. Erythrocytic Disorders. In: Henry, J.B. 19th edition. **Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods**. W.B.Saunders Company. Philadelphia. 617-663, 1996.
- ENNS, C.A.; SOUMALAINEN, H.A.; GEBHAEDT, J.E.; SCHORODER, J.; SUSSMAN,- Human transferrin receptor: expression of the receptor is assigned to chromosome 3. **Proc Natl Acad Sci USA**, **79**:3241-3245, 1982.

- FAIRBANKS, V.F. & BEAUTLER. - Iron deficiency. In : McCraw-Hill, Inc. 5th edition. **Hematology**. New York. 490-508, 1995.
- FEDER, J.N.; PENNY, D.N.; IRRINKI, A.; LEE, V.K.; LEBRON, J.A.; WATSON, N.; TSUCHIHASCHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P.J.; SCATZMAN, R.C. - The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers affinity for ligand binding. **Proc Natl Acad Sci USA** , **95**: 1472-1477, 1998
- FERGUSON, B.J.; SKIKNE, B.S.; SIMPSON, K.M.; BAYNES, R.; COOK, J. - Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. **J Lab Clin Med**, **19**: 385-390, 1992.
- FLOWERS, C.H.; SKIKNE, B.S.; ANN, M.; COOK, J.D. - The clinical measurement of Serun transferrin receptor. **J Lab Clin Med** ,**114(4)**: 368-377, 1989.
- GALANELO, R.; BARELLA, S.; TURCO, M.P.; ET AL - Serum erythropoietin and erythropoiesis in high and low fetal hemoglobin β -thalassemia intermedia patients. **Blood**, **83**: 561-565, 1994.
- GAMBINO, R.; DESVARIEUX, E.; ORTH, M.; MATAN, H.; ACKATTUPATHIL, T.;LIJOI, E.; WIMMER, C.; BOWER, J.; GUNTER, E. - The relation between chemically measured total iron-binding capacity concentrations and immunologically measured Transferrin concentrations in human serum. **Clin Chem**, **43(12)**: 2408-2412, 1997.
- GIMFERRER, E.; UBEDA, J.; REMACHA, A. - Serum transferrin receptor levels are “physiologically” high in heterozygous β -thalassemia. **Haematologica** ,**82**: 728-734,1997.
- GROTTO, H.Z.W.; CARNEIRO, M.V.; DEZOTTI, B.H.C.; KIMURA, E.M.- Utilidade do RDW e da interpretação da curva de distribuição eritrocitária no diagnóstico das anemias. **Rev Bras Pat Clin**, **30(4)**164-171,1994.

- GROTTO, H.Z.W.; VIGORITTO, A.C.; NORONHA, J.F.A.; LIMA, G.A.L. – Immature reticulocyte fraction as a criteria for marrow engraftment. Evaluation of a semi-automated reticulocyte count method. **Clin Lab Haem**, **21**: 285-287, 1999.
- HARFORD, J.B.; ROUAULT, T.A.; HUEBERS, A. H.; KLAUSNER, R.D. - Mechanisms of Iron Metabolism. In: Stamatoyannopoulos, G., Nienhuis, A.W., Majerus, P.W. and Varmus, H. Molecular. **The Molecular Basis of Blood Diseases**. 2th ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia. 351-370, 1994.
- HILLMAN, R.S. & FINCH, C.A. - **Red Cell Manual**. 6th ed. Philadelphia, F.A. Company, 1992. 178p.
- HOFFBRAND, A.V. & PETTIT, J.E. - **Essential Haematology**. 3rd edition, London, Edinburg, Boston, Blackwell Scientific publications, 1995.
- KATTAMIS, C.; HU, H.; CHENG, G.; REESE, A.L.; GONZALES-REDONDO, J.M.; KUTLAR, A.; FUTLAR, F.; HUISMAN, T.H.J.- Molecular characterization of β -thalassaemia in 174 Greek patientes with thalassaemia major. **B J Haematol**, **74**:342-346, 1990.
- KHUHAPINANT, A.; BUNYARATVEJ, A.; TATSUMI, N.; PRIBWAI, M.; FUCHAROEN, S.- Number and maturation of reticulocytes in various genotypes ofthalassemia as assessed by flow cytometry. **Acta Haematol**,**9**:119-125, 1994.
- KOEPKE, J.F. & KOEPKE, J.A. - Reticulocytes. **Clin Lab Haematol**, **8**: 169-179, 1986
- KOGHO, Y.; NISHISATO,T.; KONDO, H; TSUSHIMA, N.; NIITSU, Y.; URUSHIZAKI,I. - Circulating transferrin receptor in human serun. **Br J Haematol** ,**64**: 277-281,1986.
- LEE, G.R. - Deficiência de Ferro e Anemia Ferropriva. In : Lee, G.R., Bithell, T.C., Ltda.Foerster, J., Athens, J.W. and Lukens, J.N. 9th. **Wintrobe Hematologia Clínica** **1**: Editora São Paulo. 884-916, 1998.

- LIMA, C.S.P.; REIS, A.R.C.; GROTO, H.Z.W.; SAAD, S.T.O.; COSTA, F.F. - Comparasion of red cell distribution width and a red cell discriminant funtion incorporating volume dispersion for distinguishing iron deficiency from beta thalassemia trait in patient with microcytosis. **São Paulo Med J/Rev Paul Med,114(5):1265-1269, 1996.**
- LUKENS, J.N. & LEE, G.R. - As hemoglobinas anormais: Princípios gerais. In: Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W.; Lukens, J.N. 9th. **Wintrobe Hematologia Clínica 1: Editora Manole Ltda., São Paulo.1120-1151, 1998.**
- LUKENS, J.N. -Talassemias e Distúrbios Afins: Distúrbios Quantitativos de Síntese da Hemoglobina. -In Lee, G.R., Bithell, T.C.; Foerster, J., Athens, J.W.; Lukens, J.N. 9th. **Wintrobe HematologiaClínica 1: Editora Manole Ltda.São Paulo.1120-1151, 1998.**
- MACDOUGAL, I.C.; CAVIL, I.; HULME, B. et al. Detection of funcional iron deficiency during erythropoietin treatment: a new approach. **BMJ, 304: 225-226, 1992.**
- MASSEY, A.C.- Anemia microcítica. In: **Clínicas Médicas da América do Norte.** Interlivros Editora, São Paulo, Vol (3), 1992.
- MAST, A.E.; BLINDER, M.A.; GRONOWSKI, A.M.; CHUMLEY, C.;SCOTT, M.G.- linical utility of the soluble transferrin receptor and comparison with serum ferritin in several populations. **Clin Chem ,4(1): 45-51, 1998.**
- MILLER, Y.E.; Y.E., JONES, C.; SCOGGIN, C.; MORSE, H.; SELIGAN, P. - Chromosome 3q(22-ter) encodes the human transferrin receptor. **Am J Hum Genet, 35:573-583, 1983.**
- PARKKILA, S.; WAHEED,A.; BRITTON, R.S.; BACON, N.S.; ZHOU, X.Y.; TOMATSU, S.; FLEMING, R.E.; SLY, W.S. - Association of the transferrin receptor in human placenta with HFE, the protein defective in hereditary hemochromatosis. **Proc Natl Acad Sci USA, 94: 13,198-13,200, 1997.**

- PATERAKIS, G.S.; VOSKARIDOU, E.; LOUTRADI, A.; ROMBOS, J; LOUKOPOULOS, D. - Reticulocyte counting in thalassemic and other conditions with the R-1000 Sysmex Analyser. **Ann Hematol** ,**63**: 218-222, 1991.
- PONKA, P.- Tissue-specific regulation of iron metabolism and heme synthesis: distinct control mechanisms in erythroid cells. **Blood**, **89**: 1-25, 1997.
- PONKA, P.; BEAUMONT, C; RICHARDSON, D.R. - Function and Regulation of transferrin and ferritin. **Sem Hematol**, **35 (1)**: 35-54, 1998.
- PONKA, P. & LOK, C.N. - The transferrin receptor: role in health and disease. **Int J Biochem Cell Biol** ,**31**: 1111-1137, 1999.
- PUNNONEN, K.; IRJALA, K.; RAJAMÄKI, A. - Serum Transferrin Receptor and Its Ratio To Serum ferritin in the Diagnosis of Iron Deficiency. **Blood**, **89 (3)**: 1052-1057, 1997.
- RAMZI, S.C.; VINA, Y.K.; STANLEY, L.R. - In: Doenças das hemácias e distúrbios hematológicos. **Patologia Estrutural e Funcional**. Guanabara Koogan Rio de Janeiro 40-576, 1989.
- RAPAPORT, S.I. **Introdução à Hematologia**. 2ª edição. Rocca. São Paulo. 30-41, 1990.
- RILEY, R.- Basic principles of immunodiagnosis. In McClatchey, K. **Clin Lab Med** Williams & Wilkins. Baltimore. 1451-1512, 1994
- ROWAN, R.M.; CAVILL, I.; CORBERAND, J.X. - The reticulocyte count: progress towards the resurrection of a useful clinical test. **Clin Lab Haem**, **18(1)**: 3-8, 1996. OTHENBERGER, S.; IACOPETTA, B.J.; KÚHN, L.C. - Endocytosis of the transferrin receptor requires the cytoplasmic domain but not is phosphorylation site. **Cell**, **49**:423-431, 1987.
- RUTLEDGE, E.A.; GREEN, F.A.; ENNS C.A. - Generation of the soluble transferrin receptor requires cycling through an endosome compartment. **J Biol Chem**, **269**: 31864-31868, 1994a.

- RUTLEDGE, E.A.; ROOT, B.J.; LUCAS J.J.; ENNS, C.A. - Elimination of the O-linked glycosilation site at Thr 104 results in the generation of a soluble human transferrin receptor. **Blood**, **83**: 580-586, 1994b.
- SCHAEFER, M. & SCHAEFER L. - Hypochromic red blood cells and reticulocytes. **Kidney Int**, **55(69)**: 44-48, 1999.
- 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. **J Biol Chem**, **265**:19077-1908, 1990.
- SKIKNE, B.S.; FLOWERS, C.H.; COOK, J.D. - Serum transferrin receptor: a quantitative measure of tissue iron deficiency. **Blood**, **75(9)**: 1870-1876, 1990.
- SONATI, M.F.; KIMURA, E.M.; GROTTTO, H.Z.W.; GERVASIO, S.A.; COSTA, F.F. - Hereditary hemoglobinopathies in a population from southeast Brazil. **Hemoglobin**, **20(2)**: 175-179, 1996.
- TESTA, U.; RUTELLA, S.; MARTUCCI et al. - Autologous stem cell transplantation: evaluation of erythropoietic reconstitution by highly fluorescent reticulocyte counts, erythropoietin, soluble transferrin receptors, ferritin, TIBC and iron dosages. **Br J Haematol**, **96**: 762-775, 1997.
- TURGEON, M.L -**Clinical hematology; theory and procedures**. 3th. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia, 1999.
- WEATHERALL, D.J. - The thalasseмии. In: McCraw-Hill, Inc. 5th edition. **Hematology**. New York..581-614, 1995.
- WEELS, D.A.; DAIGNEAULT-CREECH, C.A.; SIMRELL, C.R. – Effect of iron status on Reticulocyte mean channel fluorescence. **Am J Clin Pathol**, **97**:130-134, 1992
- WICK, M., PINGGERA, W. & LEHMANN, P. - **Iron Metabolism Diagnosis and Therapy of Anemias**. 3th. Springer –Velag Wien. New York. 1-127, 1996.

- WILLIAMS, A.M. & ENNS, C.A. - Mutated transferrin receptor lacking asparagine-linked glycoprotein sites shows reduced functionality and an association with binding immunoglobulin protein. **J Biol Chem**, **266**: 17,648-17,654, 1991.
- WINTROBE, M.M.; LUKENS J.N.; LEE,G.R. - A Abordagem do Paciente com Anemia
In: Lee, G.R., Bithell, T.C., Foerster, J., Athens, J.W. and Lukens, J.N. 9th. **Wintrobe Hematologia Clínica 1**: Editora Manole Ltda. São Paulo.781:882, 1998.
- WORWOOD, M. - Iron deficiency anaemia. In: Dacie J.V. & Lewis S.M. 8th edition. **Practical Haematology**. London. Churchill Livingstone: 437-444, 1995.
- WORWOOD, M. - Influence of disease on iron status. **Proc Nutr Soc**, **56**: 409-419,1997 a.
- WORWOOD, M. - The laboratory assessment of iron status in update. **Clin Chim Acta**, **259**: 3-23, 1997 b.
- YAMANISHI, H.; KIMURA, S.; IYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; YANAGIHARA, T. - Fully Automated measurement of total iron-binding capacity in serum. **Clin Chem**,**43(12)**: 2413-2417, 1997.
- YOLDI, F.; DEBLAS, U.M.; ALVAREZ, D.; ALONSO, D.; RIVERA, F.; RODRIGUEZ, M. - Automatizacion del recuento de reticulócitos. **Sangre** ,**33**: 219-222, 1991.

6. APÊNDICES

Apêndice 1: Índices hematimétricos e dados do metabolismo do ferro nos grupos estudados
Tabela1: Grupo Anemia Ferropriva

N	IDADE	HB g/dL	VCM fl	HCM pg	RDW %	RTC x10 ³ /mm ³	RTC %	HFR %	MFR %	LFR %	HBA ₂ %	HB FETAL %	FERRO µg/dL	TIBC µg/dL	FERRITINA ng/mL	STR nmol/L	TFR mg/dL	eTFR %	ST %	TI
1	38	11,7	82,8	28,1	14,5	47	1,12	4,6	21,7	73,7	1,89	0,94	17	290	6,3	24	362	380	6	0,05
2	27	9,29	64,2	20,2	18,4	48	1,05	5,8	23	71,2	2,2	0,8	24	318	3,9	30	370	770	8	0,06
3	46	8,84	68,4	19,8	20,5	93	2,08	8,5	31,9	59,6	2,34	1,04	39	472	2	73	362	3650	8	0,11
4	41	12,2	75,1	24,6	14,7	35	0,7	3,8	31,9	64,3	2,76	0,9	24	504	3,3	38	400	1151	5	0,06
5	27	11,2	63	22,3	14,8	92	1,85	6,2	27	66,8	2,67	1	26	351	9,8	49	276	500	7	0,09
6	31	5,85	68,3	21,2	24,4	123	4,46	12	34,6	53,4	2,51	0,85	28	476	3,5	53	351	1514	6	0,08
7	41	12,4	88,2	29,2	13,2	31	0,74	21,2	17,1	61,8	2,05	1,14	5	313	5,7	78	250	1368	2	0,02
8	58	7,79	58,4	16,8	19,2	104	2,24	6,9	26	67,1	2,14	1,04	7	521	6,4	63	373	984	1	0,02
9	26	12	76,2	24,2	18,8	60	1,2	6,8	24,2	68,9	2,13	0,85	29	357	9,6	42	111	437	8	0,26
10	31	14	70,3	22	14,1	75	1,18	1,9	19,4	78,8	1,02	1	68	503	8,5	84	399	988	13	0,17
11	28	11,5	74,3	23,2	15,4	82	1,65	5,9	24,1	70	1,63	0,9	11	570	3,5	62	427	1771	19	0,03
12	16	9,48	65,2	20,4	18,1	53	1,15	7,5	12,6	79,9	1,02	0,78	21	477	6,3	59	287	936	4	0,07
13	57	10,6	72,9	23,3	19,2	69	1,52	12,9	23,3	63,8	2,53	1,12	26	464	5,8	41	382	706	6	0,07
14	24	11	88,6	29,4	14,1	108	2,9	8	41	51	1,51	1,04	32	425	2,3	94	372	4087	7	0,09
15	20	13,2	40,5	26,6	14,2	51	1,02	4,9	22,4	72,8	1,71	1,03	47	546	7,7	33	418	430	9	0,11
16	42	10,7	62,4	19,4	17,5	132	2,35	6,9	27,1	65,9	1,16	0,85	14	222	1,6	93	349	5812	6	0,04
17	20	13,3	87	27,8	13,2	59	1,22	3,1	29,4	67,5	1,96	0,79	21	467	5,8	31	290	534	7	0,07
18	59	12,4	77,7	25,3	15	129	2,65	6,8	19,4	73,8	2,04	1,01	37	518	5,8	67	340	1155	7	0,11
19	37	9,44	71,3	22,7	18,8	84	2,02	8,8	17,7	73,5	2,1	0,94	19	566	6	66	343	1100	3	0,06
20	18	12,9	78,5	25,6	14,1	83	1,65	8,2	24,3	67,5	1,72	1,09	41	418	6	23,5	360	391	10	0,11
21	16	12,1	78,2	25,5	14,6	59	1,24	6,2	17,2	76,6	2,49	1,02	32	420	23,5	28	342	119	10	0,13
22	88	6,17	78,6	18,7	19	106	4,44	8,3	32,9	58,9	2,47	0,96	9	235	3	108,5	203	3816	4	0,04
23	45	3,45	60,6	17,2	22,3	58	2,91	11,1	32,9	56	2,34	0,87	8	287	9,1	43	218	472	3	0,04
24	29	4,49	90	30,5	15,5	117	7,94	16,7	46,6	26,7	2,13	1,03	9	235	17,5	38	307	217	2	0,03
25	21	12,3	37	28,8	15,5	41	0,97	3,6	23,3	73,1	2,04	1,19	61	308	9,6	24	309	250	20	0,2
26	42	7,12	55,8	15,8	19,3	235	5,23	9,1	30,9	60	1,34	1,08	2	329	1,5	30	392	2000	1	0,005
27	63	11,5	61,5	20,1	20,7	145	2,7	6,1	35,7	58,1	2,31	1,3	5	405	6,6	XXX	XXX	XXX	1	XXX
28	20	10	72,7	24,2	20,6	127	2,4	5,2	34,3	60	1,76	1,31	28	353	8	XXX	XXX	XXX	8	XXX
29	53	16,2	75,6	23,6	26,2	305	4,43	5,5	25,6	68,9	1,97	0,85	27	420	19,9	XXX	XXX	XXX	6	XXX
30	38	11,5	70,1	22,9	20,4	135	2,7	6,1	35,7	58,1	2,06	1,03	21	630	11,7	38	372	325	3	0,06
31	34	8,74	66,8	21,5	20,1	86	2,12	14,8	32,7	52,5	1,07	0,88	34	520	3,3	43	394	1303	7	0,09
32	70	8,82	56,5	16,3	22,7	251	4,63	4,8	25,6	69,6	1,98	0,84	25	210	8,4	30	363	357	12	0,07
33	60	9,64	64	20,7	19,2	131	2,82	4,9	27	68	1,97	1,04	31	310	8,1	38	324	469	10	0,1
34	43	8,24	64,3	19,9	21,7	120	4,77	6,4	33,5	55,9	1,74	0,96	2	327	8,5	37	318	435	6	0,06
35	41	8,86	76,9	25	18,1	63	1,77	7,9	26,4	65,6	1,87	1,03	16	490	1,8	52	360	2888	3	0,04
36	40	9,98	76,9	25,2	17	93	2,33	5,2	25,4	69,4	1,85	0,94	41	520	6,1	59	400	967	8	0,1

Apêndice 1: Índices hematimétricos e dados do metabolismo do ferro nos grupos estudados
Tabela1: Grupo Anemia Ferropriva

N	IDADE	Hb g/dL	VCM fl	HCM pg	RDW %	RTC x10 ³ /mm ³	RTC %	HFR %	MFR %	LFR %	HBA2 %	HB FETAL %	FERRO ug/dL	TIBC ug/dL	FERRITINA ng/mL	STIR nmol/L	TFR mg/dL	sTfRi	ST %	Ti
38	22	11,8	74,4	24,4	17,5	88	1,84	5	19,7	75,2	2,1	1,3	17	391	4	37	298	925	4	0,06
39	44	11,2	78,4	26,2	13,9	59	1,39	5,2	20,2	74,6	2,3	1,32	7	413	12,9	41	386	318	2	0,02
40	24	12,8	86,5	28,7	15,2	78	1,84	5	26,9	68,1	2,24	1,02	41	405	4,9	63	320	1285	10	0,013
41	46	14,7	88,5	30,5	14	67	1,38	4,4	26,3	69,4	2,52	0,85	55	423	8,7	49	364	563	13	0,15
42	40	12,5	68,6	22,6	27,4	78	1,41	3,1	19,9	77	2,07	1,34	31	312	9,3	37	320	397	10	0,1
43	59	7,3	55	16,1	19,8	90	1,98	7,8	15,6	76,5	2,52	0,95	5	430	2,5	49	336	1960	10	0,01
44	26	12,1	74	24,2	14,7	49	1,18	5,6	16,1	78,3	1,51	1,19	24	419	1,8	85	330	4722	6	0,07
45	28	7,28	70,6	22,9	30,9	106	3,33	4,9	28,5	66,6	2,39	0,78	17	592	16,1	XXX	XXX	XXX	3	XXX
46	72	9,4	70	22,1	23,7	92	2,17	8,1	27,3	64,6	2,59	1,6	8	321	12,5	XXX	XXX	XXX	2	XXX
47	33	13,5	72,1	23,1	17,5	80	1,37	3,1	17,2	79,7	2,04	1,16	46	402	12,7	XXX	XXX	XXX	11	XXX
48	27	11,1	81,3	28,1	16,9	70	1,78	4,2	22,8	73,1	1,96	0,9	17	350	6,3	XXX	XXX	XXX	5	XXX
49	38	12	80,9	27,4	16,7	60	1,37	7	23,5	69,5	2,11	1,4	76	403	12,4	XXX	XXX	XXX	19	XXX
50	45	10,5	75,2	24,3	19,2	53	1,24	7,6	24,3	68,1	2,41	0,76	60	581	4,6	XXX	XXX	XXX	10	XXX

XXX: Análises não realizadas

Hb: Hemoglobina

VCM: Volume Corpuscular Médio

HCM: Conteúdo Corpuscular Médio

RDW: Distribuição das hemácias

HFR: Fração de alta fluorescência

MFR: Fração de média fluorescência

LFR: Fração de baixa fluorescência

TFR: Transferrina

sTfRi: Forma solúvel do receptor da transferrina

ST: Saturação da transferrina (Ferro/TIBC)

Ti: Índice da transferrina (Ferro/transferrina)

Apêndice 1: Dados hematimétricos e do metabolismo do ferro nos grupos estudados.

Tabela2: Grupo Beta Talassemia

N	IDADE	HB	VCM	HCM	RDW	RTC#	RTC%	HFR	MFR	LFR	HBA2	HBFETAL	FERRO	TIBC	FERRITINA	STFR	TFR	sTFRi	TI
		g/dL	fL	pg	%	10 ³ /mm ³	%	%	%	%	%	%	µg/dl	ug/dl	ng/mL	nmol/L	mg/dL		
1	56	13,3	70,8	23,1	17,2	88	1,52	7	24,1	68,9	4,3	1,8	82	484	72	21	125	29	0,66
2	60	11,1	67,9	21,9	17,2	72	1,42	5,2	22,5	72,3	4,7	2,2	95	498	25	21,5	276	86	0,34
3	43	9,11	64,4	21	16,1	76	1,74	4,6	24,7	70,7	4,2	4	83	246	102	23	138	23	0,6
4	28	10,2	62,7	19,8	16,3	78	1,51	1,9	26,7	71,4	5	1,5	71	480	60	20	248	33	0,3
5	37	10,2	74,5	24,1	17	143	3,36	11,1	30,7	58,2	4	2	90	373	232	41	207	17,7	0,22
6	56	11,7	61,9	20	16,4	113	1,94	3,8	26,2	69,9	4,8	1,6	93	398	38	40	220	10,5	0,42
7	16	10,8	61,9	19,7	17,3	122	2,22	6	31,8	62,2	4,8	1,3	140	689	115	21,5	354	19	0,4
8	38	11,5	61,9	20,4	16,7	216	3,83	4,5	24,9	70,6	6	1,3	81	430	32	20	236	63	0,19
9	29	13,6	64,2	20,9	16,4	72	1,11	3,2	22,2	74,6	4,7	1,7	59	441	101	18,8	215	19	0,3
10	47	10,6	64,7	21,2	17,8	205	4,11	8,9	26,1	65	4,3	1,4	67	356	682	22,5	168	3	0,4
11	51	11,8	62,7	21,6	17	95	1,77	6	21,5	72,5	4,39	2,12	72	380	240	17	175	10	0,41
12	45	12,5	63,7	21	17,4	144	2,84	4,3	21,3	72	5,4	0,8	52	399	133	91	217	68	0,24
13	40	11,4	60,5	20,1	17,6	77	1,36	6,6	22	71,4	4,6	1,6	57	548	27	72	212	270	0,3
14	37	11,8	61,5	19,6	17,4	135	2,25	6,8	33,8	59,4	5,1	1,9	95	596	52	17	277	33	0,34
15	34	11,4	61,6	19,3	16,9	154	2,61	5,7	31,2	63,1	5,2	2,9	104	408	49	34,5	277	70	0,37
16	37	10,3	61,8	19,8	15,5	95	1,83	4,2	21,9	73,9	5,3	2,2	105	439	104	48	272	46	0,39
17	31	10,6	59,8	19,2	18,4	182	3,31	6,7	31,3	62	4,6	1	81	572	203	20	236	10	0,34
18	53	11,3	61	18,8	16,4	214	3,58	5,2	29	65,8	5,2	1,3	78	457	24	34,5	304	140	0,26
19	30	12,4	65,3	19,9	16,2	164	2,63	9,7	29,1	61,2	5	1,5	136	330	145	28	240	20	0,57
20	29	12,1	64,7	20,7	18,3	186	3,17	9,1	29,1	61,7	4,6	3,1	97	538	34	18	235	53	0,41
21	66	12,2	60,5	18,9	17,9	80	1,24	4,8	21,5	73,7	4,6	1,6	74	606	53	20	203	38	0,36
22	25	13	63,3	19,5	17,7	64	0,96	6,3	22,1	71,6	5,5	0,9	92	356	170	18	235	10	0,39
23	39	12,3	59,6	19,1	16,8	129	2,02	6,8	25,3	67,9	5	1,2	112	357	39	15	266	40	0,42
24	27	10,9	61,3	19,5	16,9	110	1,96	10,4	27,7	61,8	4	1,1	41	350	113	21	214	20	0,2
25	47	13,1	69	22,2	16,7	102	1,73	6,9	30,5	62,6	5,7	2,1	74	380	29	19	179	70	0,41
26	25	10	74,8	25	17,8	197	4,91	15	34,1	50,9	4,3	2,5	147	248	36,2	25,5	203	70	0,72
27	26	16,3	89,2	30,5	14,5	69	1,29	6,6	25,9	67,6	4,8	1,2	74	279	26	15	186	60	0,4
28	19	12,9	61,5	19,9	17,1	126	2,34	5,6	25,9	68,5	5,1	2,01	104	321	204	16	189	10	0,55
29	12	5,7	53,8	15	20,7	145	3,81	4,3	19,4	76,3	5,4	2,4	109	386	40	21	366	53	0,41
30	35	10,5	63,3	19,5	16,1	126	2,34	5,6	25,9	68,5	5,1	2,01	104	321	204	23	278	11	0,37
31	72	10,5	65,9	21,1	21,2	126	2,54	8,4	28,5	63,1	5,1	2,01	102	403	199	30,5	134	16	0,76
32	49	11,4	64,8	20,9	16,9	131	2,41	6,4	30,2	63,4	4,8	2,46	97	400	149	23	167	15	0,58
33	22	12	59,8	19	18	355	5,61	6,8	29,7	63,5	4,6	2,07	105	296	181	21	304	12	0,34
34	58	11,9	68,1	23,1	18,4	84	1,64	8,4	28,3	63,3	4,7	1	44	369	564	16	246	3	0,18
35	33	10,3	71,8	23,8	28,2	174	4,02	10,3	29,4	60,3	5,05	2,5	54	301	657	23	278	4	0,19

Apêndice 1: Dados hematimétricos e do metabolismo do ferro nos grupos estudados.

Tabela2: Grupo Beta Talassemia

N	IDADE	HB	VCM	HCM	RDW	RTC#	RTC%	HFR	MFR	LFR	HBA2	HBFETAL	FERRO	TIBC	FERRITINA	STFR	TFR	STFRF	TI
		g/dL	fL	pg	%	10 ³ /min	%	%	%	%	%	%	µg/dl	ug/dl	ng/mL	nmol/L	mg/dL		
36	24	15,4	74,8	24,7	17,2	126	2,02	4,8	26,3	68,9	5,2	2,01	162	334	364	XXX	XXX	XXX	XXX
37	29	13,5	65,7	22,2	16,8	136	2,22	8,4	23,6	68	4,44	2,1	116	291	161	XXX	XXX	XXX	XXX
38	33	9,08	56,3	17,4	23	151	2,9	9,7	23,3	67	4,8	3,2	24	401	40	XXX	XXX	XXX	XXX
39	43	10	61,9	20,7	20,8	194	3,99	5,8	33,5	60,6	5,2	1,7	120	320	92	XXX	XXX	XXX	XXX
40	38	10,5	60,7	19,9	17,2	107	2,02	6,8	24,6	68,6	4,8	1,12	67	275	56,3	XXX	XXX	XXX	XXX
41	16	11,9	69,6	22,9	16,3	85	1,65	7,6	17,2	75,2	5,1	1,41	45	399	107	XXX	XXX	XXX	XXX

XXX: ANÁLISES NÃO REALIZADAS

Tabela 3: Grupo Controle

N	IDADE	HB g/dL	VCM fl	HGM pg	RDW %	RTC x10 ⁹ /mm ³	RTC %	HFR %	MFR %	LFR %	HBA2 %	HB FETAL %	FERRO µ/dL	TIBC µ/dL	FERRITINA ng/mL	STFR nmol/L	TFR mg/dL
1	27	13,8	86,7	29,9	13,6	0,61	28	14,4	22,3	63,3	2,37	1,99	146	339	115	16	245
2	53	12,5	84,1	28,7	14,4	0,77	34	18,9	23,5	57,6	2,48	2,03	62	376	59,5	15	272
3	45	16,4	92,1	31,6	13,5	1,6	83	12,4	28,3	59,3	1,72	1,16	114	439	105	17,5	248
4	29	14,1	85,1	29	14,1	1,54	75	8,1	31,4	60,6	2,67	1,32	93	342	105	18,5	287
5	31	14,1	86,9	30,2	14	1,47	68	6,5	26,5	67	1,89	1,18	122	442	108	17,3	317
6	58	15	89,2	30,7	14	1,31	64	10,7	26,3	63	2,47	1,14	50	316	91,5	15,5	225
7	35	13,8	88,8	30,5	14	1,36	62	6,2	21,7	72,1	2,72	0,9	114	339	19,4	15	236
8	28	14,5	91,6	31,7	13,5	1,66	76	11,6	26,9	61,5	2,34	1,04	120	245	89,8	13,5	283
9	26	15,3	86,4	29,9	14,2	1,27	65	9,2	25,1	65,6	2,34	1,74	83	312	23,5	16,5	229
10	32	13,4	81	27	13,9	1,56	78	4,7	27,2	68,1	2,76	2	43	369	32,4	14,5	250
11	21	16,9	88,8	31	14,1	1,02	55	3,1	23,1	73,8	2,58	1,03	149	253	40	XXX	XXX
12	29	15,1	89,5	29,9	13,6	1,24	61	4,3	30,8	64,9	2,35	1,16	85	456	47,2	XXX	XXX
13	33	15	83,9	28	14,5	1,4	73	4,9	27,3	67,8	2,58	1,31	84	251	119	XXX	XXX
14	57	15,1	88,1	30,6	14,3	1,48	73	5,1	32,4	62,5	2,3	1,32	81	355	137	15	244
15	53	13,4	90,4	31,2	13,5	1,56	78	4,7	27,2	68,1	2,96	2	102	288	64,7	16	248
16	35	14,3	84,2	29,6	15,4	1,28	62	5,9	24,6	69,5	2,68	1,29	59	396	209	XXX	XXX
17	33	13,1	83,9	29	13,7	1,19	54	4,2	22,9	72,9	2,67	1,34	54	318	66,2	XXX	XXX
18	23	13,2	89,2	31,4	13,3	0,69	29	5,9	25,5	68,6	2,48	1,63	42	367	95,1	XXX	XXX
19	21	13,1	90,3	30,4	13,4	1,52	66	3,3	27,5	69,2	2,35	1,42	55	418	58	XXX	XXX
20	51	14,1	80,7	27,2	15,4	1,48	77	5,3	28,8	65,9	2,34	0,73	66	354	111	XXX	XXX
21	21	13,9	80,9	27,3	14,5	1,23	62	3,6	25,3	71,1	2,51	0,78	69	403	43,9	XXX	XXX
22	45	14,1	93,1	32	14	1,12	50	5,2	30,9	63,9	2,05	0,73	107	266	109	XXX	XXX
23	29	14,4	85,8	28,7	14,6	1,06	53	6,3	32,5	61,1	2,34	1,07	59	430	72	XXX	XXX
24	34	14,4	89,8	30,9	13,5	1,61	75	4,9	28,7	66,4	3,08	1,14	144	378	123	XXX	XXX
25	57	16,7	84,1	28,6	14	1,47	86	4,1	23,8	72,1	2,5	1,16	104	403	188	XXX	XXX
26	43	13,7	86,5	29,2	13,4	1,32	62	4,6	31,6	73,8	2,53	0,57	78	350	77,9	16	264
27	36	15,4	85,4	28,5	14,1	1,18	64	5,1	30,4	64,5	2,59	0,65	120	383	100	15,5	275
28	51	15,1	85,7	28,6	14,2	0,99	52	7,7	28,5	63,8	2,49	0,92	105	322	208	XXX	XXX
29	45	15,1	82,6	28,1	15,8	1,87	101	4,6	30,3	65,1	1,51	1,19	101	465	86,8	XXX	XXX
30	30	17,1	91,7	30,7	13,4	0,72	40	10,1	17,2	72,7	2,34	0,87	93	355	210	15	243
31	48	17,3	87,9	29,2	14	1,57	93	5,3	25,9	68,8	2,47	0,59	123	428	142	20	299
32	26	15,9	91,3	30,2	14,1	1,68	89	8,5	31,3	60,2	2,59	1,6	99	307	334	19,5	214
33	19	17,4	86,8	29,2	14	1,29	76	3,2	23	73,8	2,43	1,76	147	330	163	XXX	XXX
34	33	13,5	92,7	31,4	13,4	1,55	67	5	32	62,9	2,51	0,76	134	449	72,9	XXX	XXX
35	50	13,1	86,1	29,9	14,5	0,96	42	7,4	25	67,6	2,14	0,61	123	290	59,9	22,5	217
36	48	13,5	84,2	29	14,4	1,31	61	7,2	26,4	66,4	2,13	0,99	117	396	28,2	16,5	303
37	37	14,6	91,2	31,8	12,5	1,44	66	7	31,2	61,9	1,71	1,36	132	350	40,9	14	259

Tabela 3: Grupo Controle

N	IDADE	HB g/dL	VCM fl	HCM pg	RDW %	RTC $\times 10^3/\text{mm}^3$	RTC %	HFR %	MFR %	LFR %	HBA2 %	HB FETAL %	FERRO $\mu\text{g/dL}$	TIBC $\mu\text{g/dL}$	FERRITINA ng/mL	STFR nmol/L	TFR mg/dL
39	31	14,9	86,2	30,1	14,2	1,49	74	5,1	28,1	66,9	1,84	1,69	99	467	39,9	XXX	XXX
40	25	12,7	87,9	30,7	14,3	1,4	58	6,4	25,3	68,3	1,87	0,94	142	320	87	XXX	XXX
41	44	16,8	88,1	29,8	14,4	1,52	86	5,6	30,6	63,8	2,75	0,56	132	370	275	19	258
42	31	13,3	85	28,9	13,4	1,34	61	3,1	24,4	72,5	2,11	1,4	85	369	45,9	27	268
43	53	16,8	83,1	27,5	14,3	1,09	67	7	26,3	66,7	2,13	0,78	92	298	44,6	XXX	XXX
44	56	16,9	89,5	31,2	14,7	1,68	91	10,4	30,3	59,2	2,25	1,1	85	308	96	23,5	220
45	23	16,3	91,4	32	12,9	0,84	43	7,7	19	73,3	2,32	1,3	134	314	202	XXX	XXX
46	51	13,4	88,6	30,3	14,9	1,66	73	4,4	29,5	66,1	2,18	1,3	53	430	31,2	XXX	XXX
47	43	12,8	92,4	31,1	14,2	1,48	61	7,1	29,8	62,1	2,53	0,8	59	453	71,6	XXX	XXX
48	44	14,9	88,9	31,2	14,1	1,47	70	3,9	28,2	68	2,04	1,16	117	321	35	XXX	XXX
49	35	13	84,6	28,2	12,3	2,1	97	2,9	27,6	69,5	2,4	1	102	336	17,7	17	240
50	41	16,9	88,1	30,1	14,7	1,14	64	5,2	27,8	66,9	2,53	0,7	69	337	103	15	250
51	33	14,7	85,7	29,1	14,3	1,26	64	4,2	24,7	71,1	2,36	1,31	138	285	55,5	12,5	212
52	50	16,1	90,2	31,1	14,9	1,24	64	3,8	32	64,2	2,1	1,18	80	325	45,7	15,5	223
53	50	13	83,4	27,1	14,3	1,5	64	3,4	28,7	67,9	1,96	0,9	101	303	43,3	XXX	XXX
54	50	12,5	87,4	29,8	13,5	1,76	74	5,7	28,3	66	2,04	0,84	90	356	188	15	237
55	38	16,7	88,9	31,2	14,1	2,5	134	5,2	28,2	66,5	2,57	1,6	80	327	138	15,5	226
56	32	16,1	91,2	31,4	14,4	1,34	69	6,5	34,8	58,6	2,3	1,23	93	393	178	XXX	XXX
57	40	14,6	87,4	30,5	14	1,66	80	5,3	31,7	63	3,11	1,2	83	325	140	XXX	XXX

XXX: ANÁLISE NÃO REALIZADAS

Apêndice 2: Análise estatística descritiva

Medidas de posição e dispersão por grupo.

----- GRUPO=AF -----

Variável	N	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo
IDADE	50	38.3200	16.0426	38.0000	16.0000	88.0000
HB	50	10.5136	2.5541	11.0500	3.4500	16.2000
RDW	50	18.238	3.854544	18.10	13.20	30.90
VCM	50	72.3480	10.2018	73.45	40.50	90.0000
HCM	50	23.4920	3.8391	23.4500	15.8000	30.5000
RTCP	50	2.2584	1.3931	1.8450	0.7000	7.9400
RTCN	50	93.7000	52.4347	83.5000	31.0000	305.0
HFR	50	6.9620	3.5470	6.1500	1.9000	21.2000
MFR	50	26.0440	6.8244	25.6000	12.6000	46.6000
LFR	50	66.8940	9.3940	68.1000	26.7000	79.9000
HBA2	50	2.0436	0.4335	2.0800	1.0200	2.7600
HBFETAL	50	1.0148	0.1856	1.0050	0.7300	1.6000
FERRO	50	26.1600	17.4547	24.0000	2.0000	76.0000
TIBC	50	409.2	105.9	415.5	210.0	630.0
FERRITIN	50	7.4040	4.7539	6.3000	1.5000	23.5000
STFR	41	50.2561	21.4506	43.0000	23.5000	108.5
TFR	41	337.6	61.3021	351.0	111.0	427.0
STFRF	41	1287.6	1329.2	925.0	119.0	5812.0
TI	41	0.0760	0.0521	0.0700	0.00500	0.2600
TS	50	0.0702	0.0448	0.0650	0.0100	0.2000

----- GRUPO=B -----

Variável	N	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo
IDADE	41	37.439024	13.994729	37.0000	12.0000	72.0000
HB	41	11.490000	1.749460	11.4000	5.7000	16.3000
VCM	41	64.712195	6.078824	63.3000	53.8000	89.2000
HCM	41	20.900000	2.473560	20.4000	15.0000	30.50000
RDW	41	17.700000	2.293251	17.2000	14.5000	28.2000
RTCP	41	2.481220	1.076358	2.2200	0.9600	5.610000
RTCN	41	132.878049	56.073253	126.0000	64.0000	355.0000
HFR	41	6.736585	2.454665	6.6000	1.9000	15.0000
MFR	41	26.414634	4.102655	26.1000	17.2000	34.1000
LFR	41	66.782927	5.495403	67.9000	50.9000	76.3000
HBA2	41	4.865366	0.439460	4.8000	4.0000	6.0000
HBFETAL	41	1.849268	0.678643	1.8000	0.8000	4.0000
FERRO	41	87.926829	29.687868	90.0000	24.0000	162.0000
TIBC	41	401.341463	101.728956	386.0000	246.0000	689.0000
FERRITIN	41	145.231707	159.439952	102.0000	24.0000	682.0000
STFR	35	26.751429	15.867862	21.0000	15.0000	91.0000
TFR	35	230.857143	56.522844	235.0000	125.0000	366.0000
STFRF	35	41.577143	49.627282	23.0000	3.0000	270.0000
TI	35	0.392571	0.146013	0.3900	0.1800	0.7600
TS	41	0.247073	0.120794	0.23000	0.1000	0.6000

----- GRUPO=N -----

Variável	N	Média	D.P.	Mediana	Mínimo	Máximo
IDADE	57	38.0175	11.0881	35.0000	19.0000	58.0000
HB	57	14.7526	1.4474	14.6000	12.5000	17.4000
VCM	57	87.3649	3.1535	87.4000	80.7000	93.1000
HCM	57	29.8561	1.3400	29.9000	27.0000	32.0000
RDW	57	14.0579	0.6361	14.1000	12.3000	15.8000
RTCP	57	1.3730	0.3298	1.4000	0.6100	2.5000
RTCN	57	67.9825	17.8350	66.0000	28.0000	134.0
HFR	57	6.2667	2.9703	5.3000	2.9000	18.9000
MFR	57	27.4807	3.4940	27.8000	17.2000	34.8000
LFR	57	66.4035	4.2125	66.5000	57.6000	73.8000
HBA2	57	2.3565	0.3245	2.3600	1.5100	3.1100
HBFETAL	57	1.1711	0.3801	1.1600	0.5600	2.0300
FERRO	57	97.1930	29.4039	99.0000	42.0000	149.0
TIBC	57	354.2	57.5806	350.0	245.0	467.0
FERRITIN	57	103.8	72.4244	89.8000	17.7000	334.0
STFR	30	16.8767	3.0969	16.0000	12.5000	27.0000
TFR	30	249.8	28.7179	246.5	202.0	317.0
STFRF	30	27.6510	23.6008	17.5000	5.2000	99.4000
TI	30	0.4077	0.1123	0.4000	0.2000	0.6500
TS	56	0.2838	0.1063	0.2700	0.1200	0.6000

Apêndice 3: Testes de correlação

Tabela 1- Níveis descritivos dos testes de Kruskal-Wallis para comparação de variáveis entre os grupos.

Variável	p-valor	Localização das diferenças
IDADE	0.8787	-
RTCN	0.0001	AF e B ; AF e N ; B e N
HFR	0.2180	-
LFR	0.3786	-
RDW	0.0001	AF e N ; B e N
STFRF	0.0001	AF e B ; AF e N
MFR	0.1471	-
TFR	0.0001	AF e B ; AF e N
TI	0.0001	AF e B ; AF e N
STFR	0.0001	AF e B ; AF e N ; B e N

Tabela 2- Coeficientes de correlação linear de Spearman entre variáveis, no grupo Anemia Ferropriva.

Correlação entre	n	Coefficiente	p-valor
HFR e STFR	41	0.34925	0.0252
STFRF e FERRO	41	-0.14021	0.3819
STFR e FERRO	41	-0.02702	0.8668
TS e TI	41	0.69404	0.0001
TIBC e TFR	41	0.51747	0.0005
TFR e TS	41	0.14320	0.3717
STFR e FERRITINA	41	-0.38457	0.0130
STFR e RTCN	41	0.17054	0.2864
STFR e HB	41	-0.11174	0.4867

Tabela 3- Coeficientes de correlação linear de Spearman entre variáveis, no grupo β talassemia.

Correlação entre	n	Coefficiente	p-valor
HFR e STFR	35	-0.0574	0.7433
STFRF e FERRO	35	0.1037	0.5535
STFR e FERRO	35	0.1097	0.5305
TS e TI	35	0.6058	0.0001
TIBC e TFR	35	0.1666	0.3387
TFR e TS	35	0.0462	0.7921
STFR e FERRITINA	35	0.0045	0.9796
STFR e RTCN	35	0.2458	0.1546
STFR e HB	35	-0.4899	0.0028

Tabela 4 - Coeficientes de correlação linear de Spearman entre variáveis, no grupo Normal.

Correlação entre	n	Coeficiente	p-valor
HFR e STFR	30	0.04948	0.7951
STFRF e FERRO	30	-0.16771	0.3757
STFR e FERRO	30	0.17087	0.3666
TS e TI	30	0.90438	0.0001
TIBC e TFR	30	0.68867	0.0001
TFR e TS	30	-0.14532	0.4435
STFR e FERRITINA	30	0.22019	0.2423
STFR e RTCN	30	0.26223	0.1615
STFR e HB	30	0.12113	0.5237

Apêndice 4: Curvas ROC e diagrama de pontos

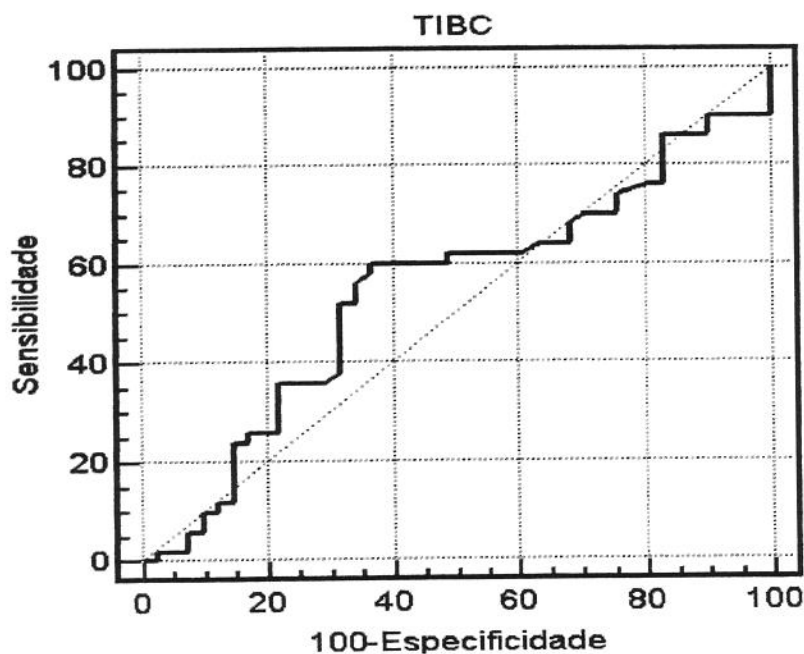


Figura 1 - Curva ROC estimada para a medida de TIBC na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 54,0%.

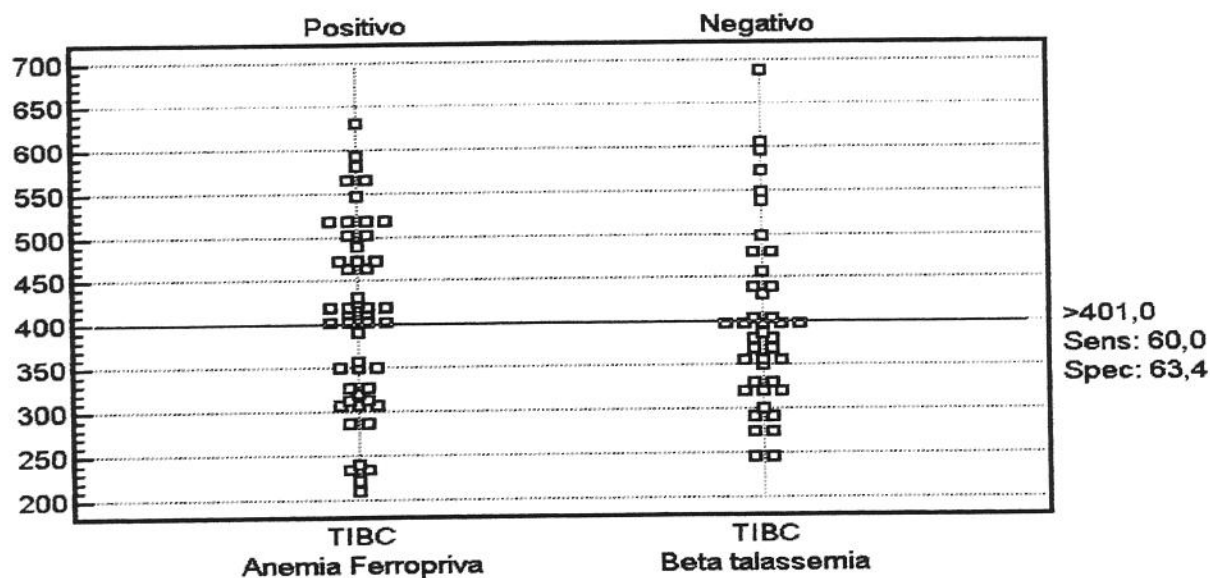


Figura 2 - Diagrama de pontos para a medida de TIBC entre os grupos AF e B. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

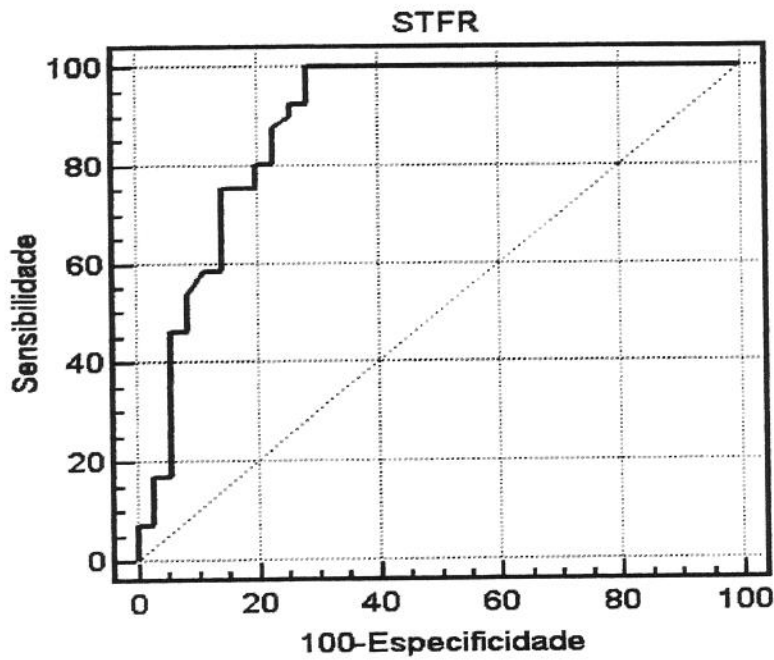


Figura 3 - Curva ROC estimada para a medida de STFR na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 88,5%.

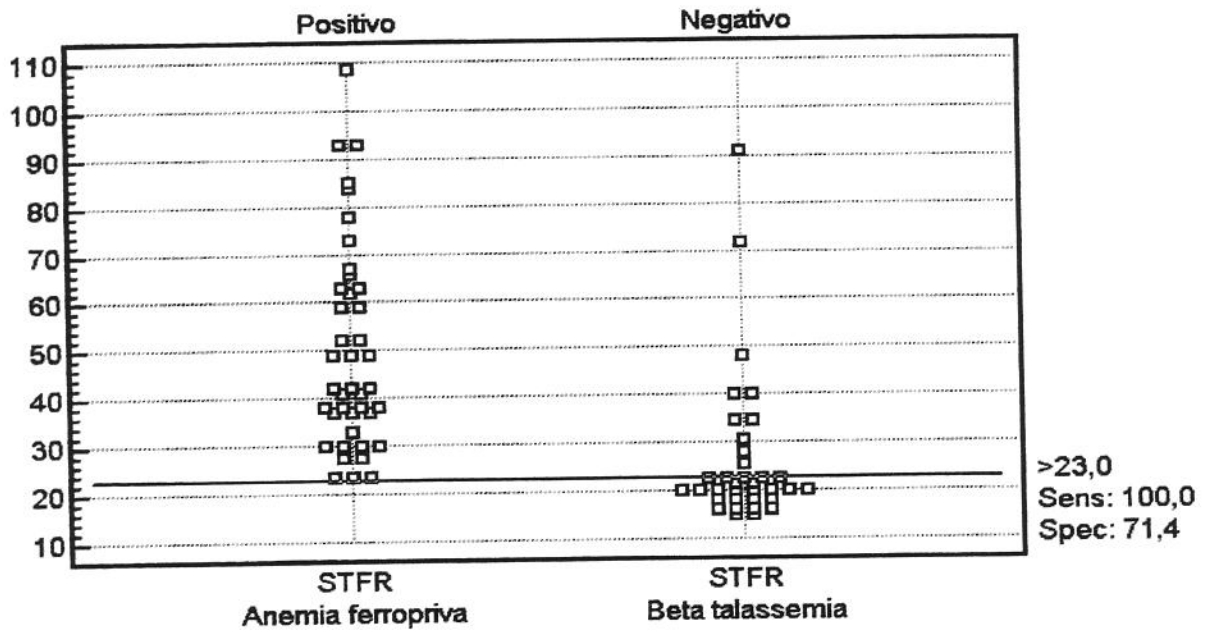


Figura 4 - Diagrama de pontos para a medida de STFR entre os grupos AF e B. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.
Análise da variável TFR

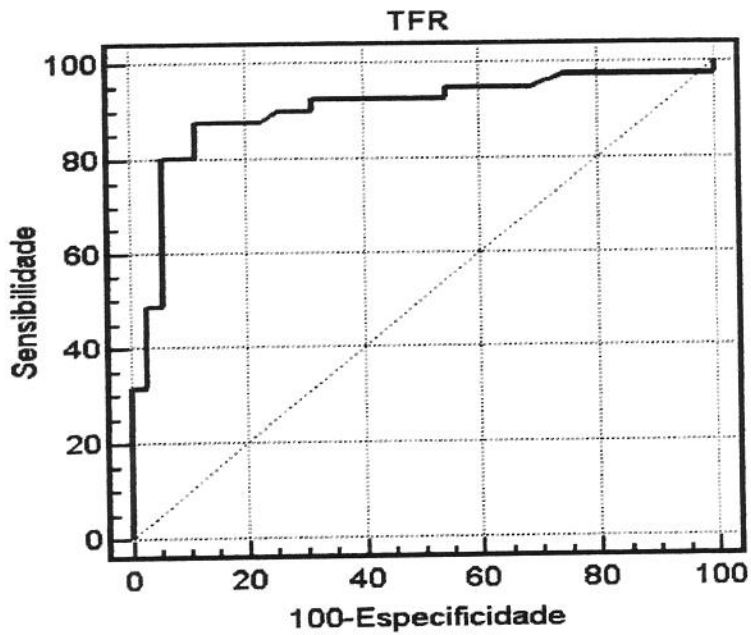


Figura 5 - Curva ROC estimada para a medida de TFR na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 90,0%.

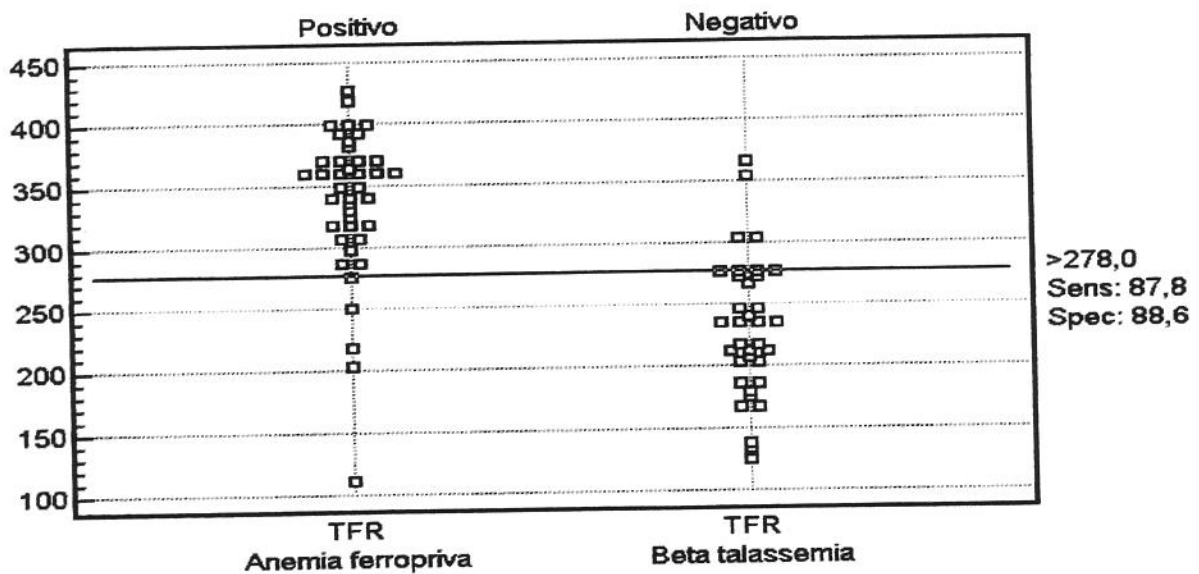


Figura 6 - Diagrama de pontos para a medida de TFR entre os grupos AF e B. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

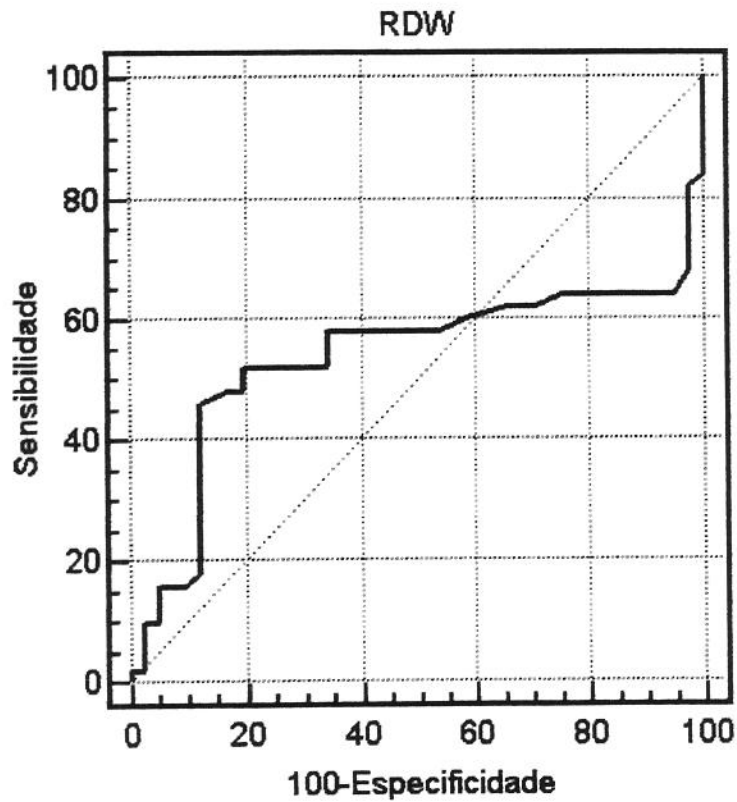


Figura 7 - Curva ROC estimada para a medida de RDW na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 53,4%.

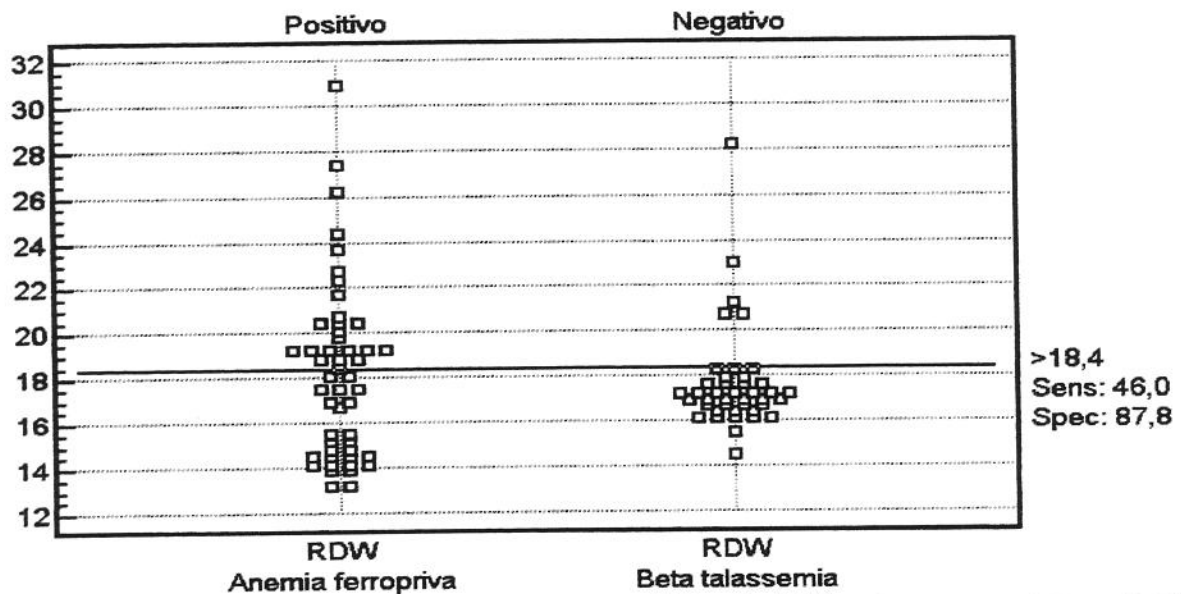


Figura 8 - Diagrama de pontos para a medida de RDW entre os grupos. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

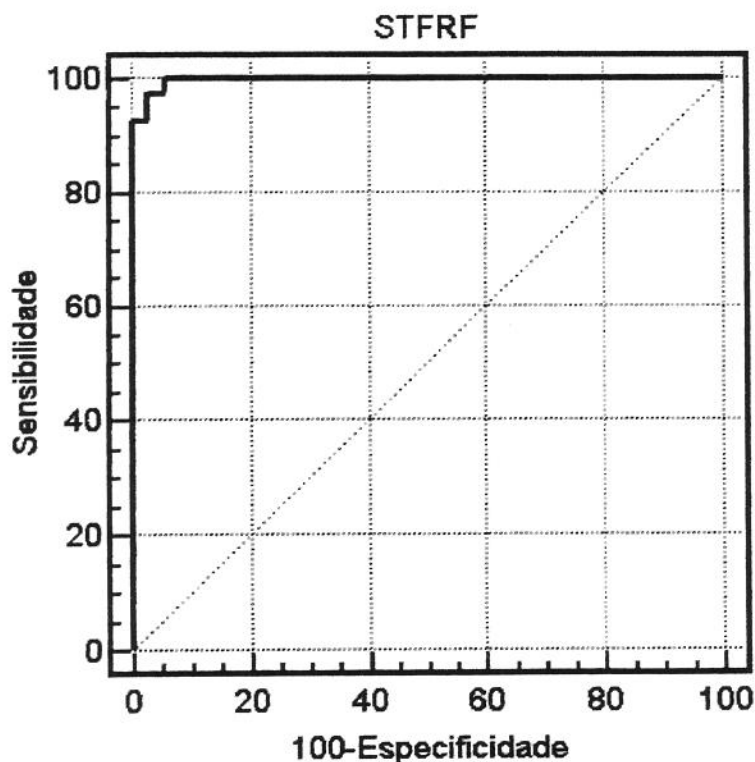


Figura 9 - Curva ROC estimada para a medida de STFR/Ferritina na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 99,7%.

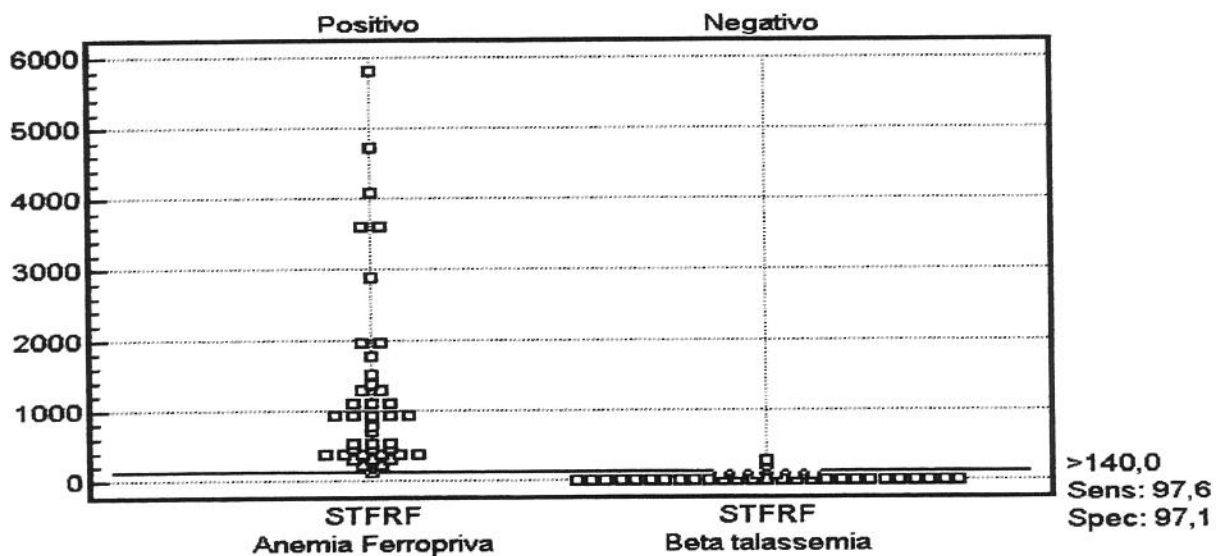


Figura 10 - Diagrama de pontos para a medida de STFR/Ferritina entre os grupos AF e B. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

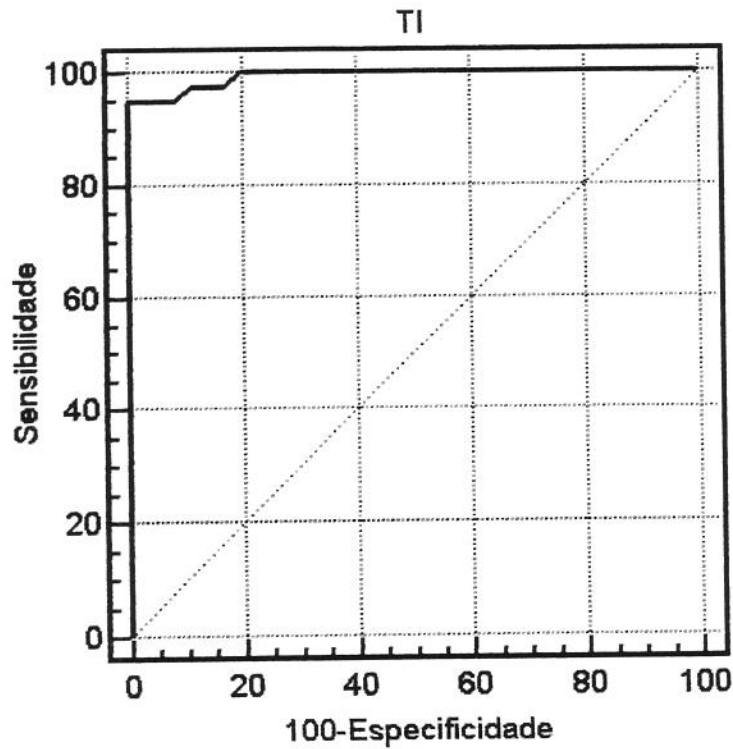


Figura 11 - Curva ROC estimada para a medida de TI na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 99,3%.

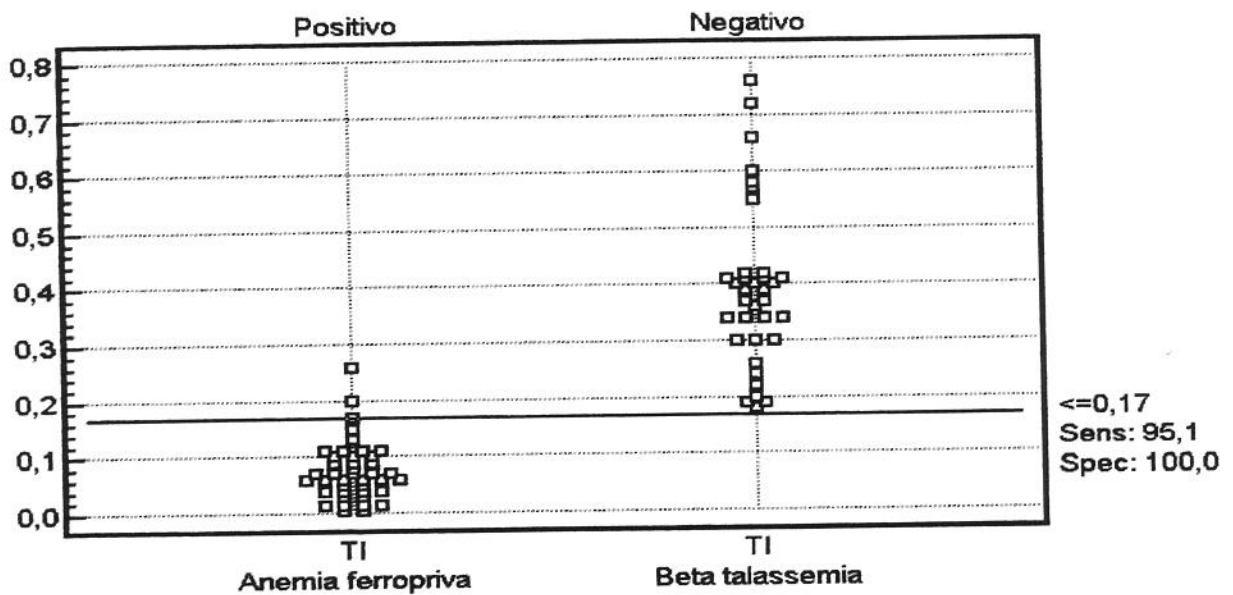


Figura 12 - Diagrama de pontos para a medida de TI entre os grupos AF e B. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

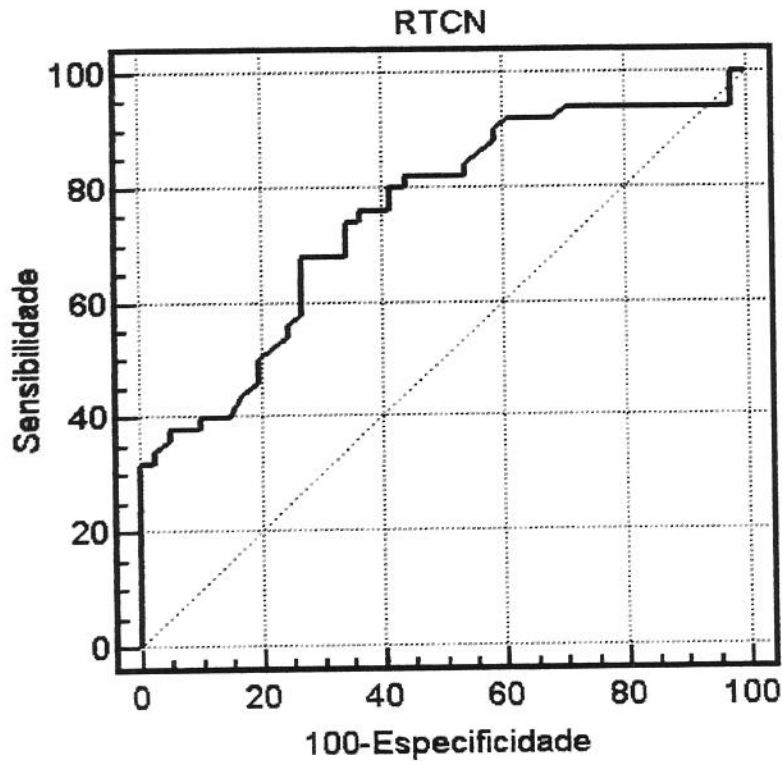


Figura 13 - Curva ROC estimada para a medida de RTCN na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 75,0%.

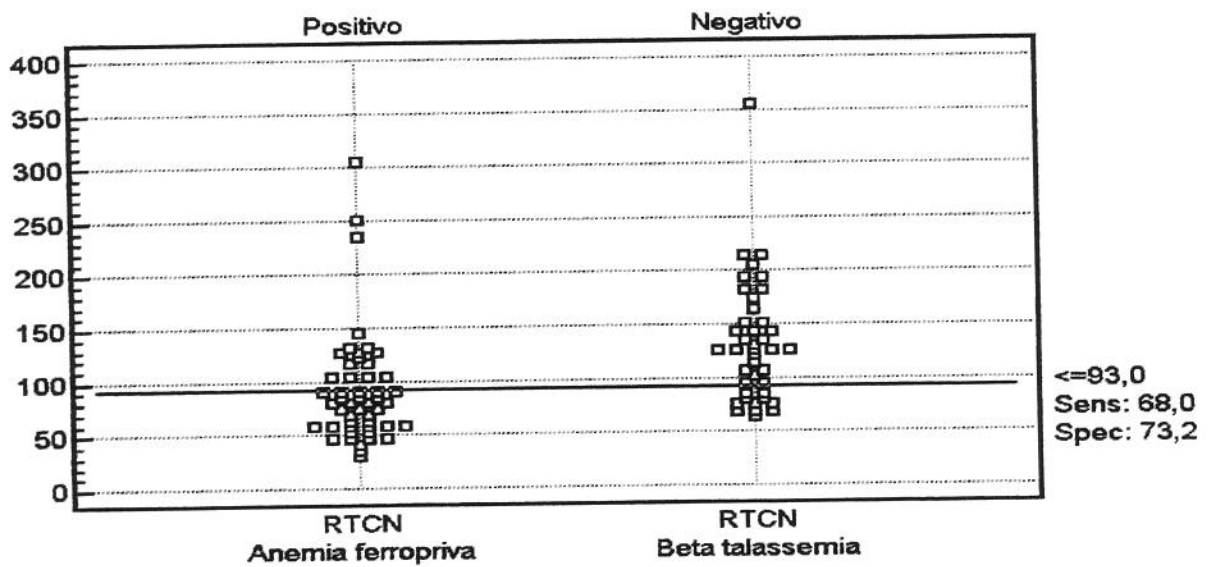


Figura 14 - Diagrama de pontos para a medida de RTCN entre os grupos. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.

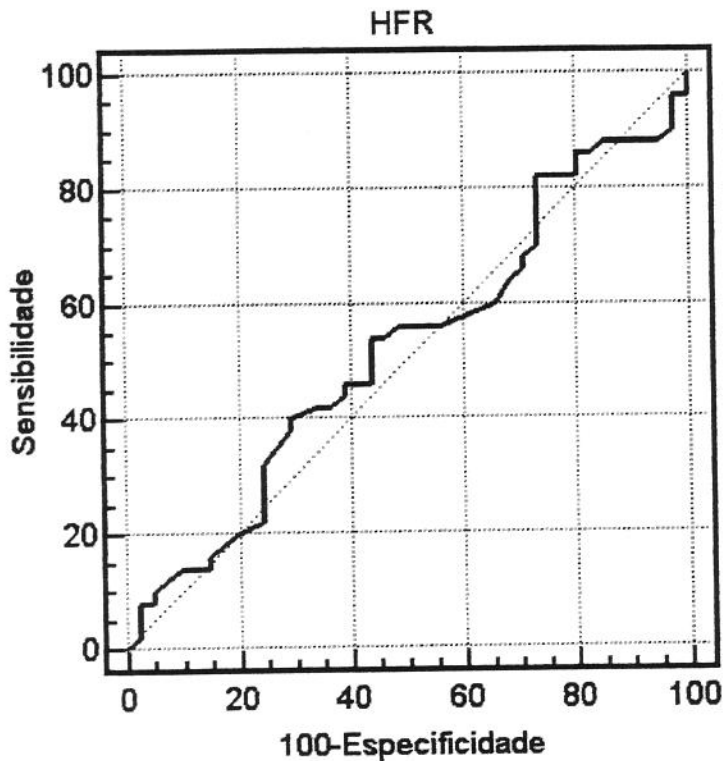


Figura 15 - Curva ROC estimada para a medida de HFR na identificação de Anemia Ferropriva. A acurácia foi de 51,9%.

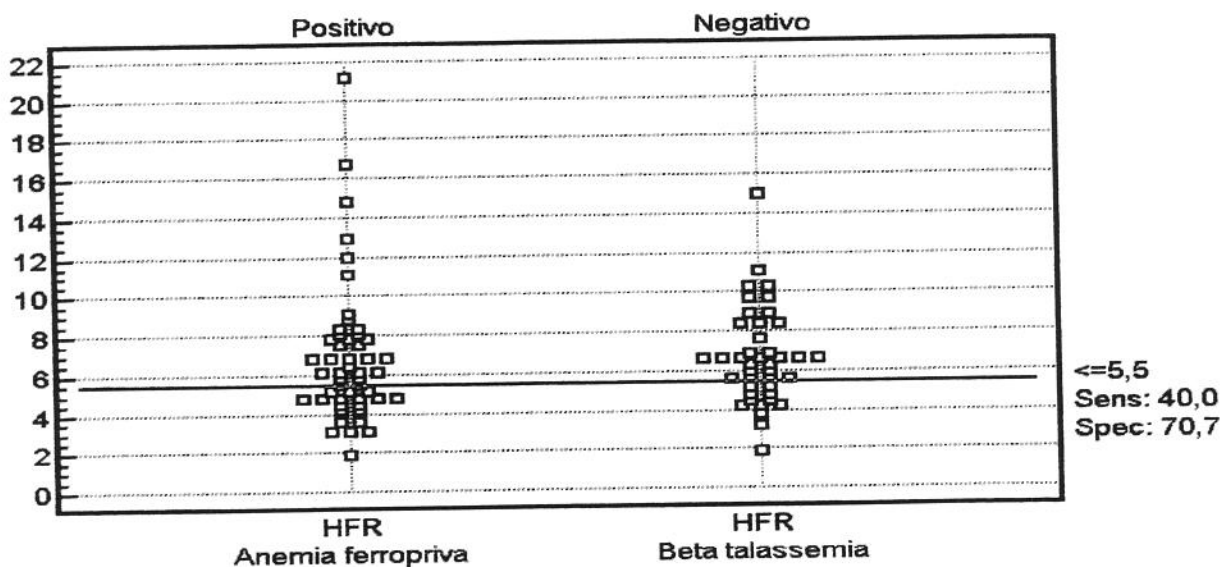


Figura 16 - Diagrama de pontos para a medida de HFR entre os grupos. O valor de corte e os valores de sensibilidade e especificidade deste ponto são apresentados.