



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

ALVARO HENRIQUE JUNQUEIRA TAVARES

SOBRECARGA DE FERRO EM PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

Iron overload in patients with hemoglobinopathies

CAMPINAS

2019

ALVARO HENRIQUE JUNQUEIRA TAVARES

SOBRECARGA DE FERRO EM PACIENTES COM HEMOGLOBINOPATIAS

Iron overload in patients with hemoglobinopathies

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de mestre em ciências na área de clínica médica.

ORIENTADOR: KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELO
ALUNO ALVARO HENRIQUE JUNQUEIRA TAVARES E ORIENTADO PELO
PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

CAMPINAS

2019

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

T197s Tavares, Alvaro Henrique Junqueira, 1993-
Sobrecarga de ferro em pacientes com hemoglobinopatias / Alvaro
Henrique Junqueira Tavares. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Kleber Yotsumoto Fertrin.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Ciências Médicas.

1. Ferritinas. 2. Anemia falciforme. 3. Talassemia. 4. Terapia por quelação.
I. Fertrin, Kleber Yotsumoto, 1980-. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Iron overload in patients with hemoglobinopathies

Palavras-chave em inglês:

Ferritin

Sickle cell disease

Thalassemia

Chelation therapy

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestre em Ciências

Banca examinadora:

Kleber Yotsumoto Fertrin [Orientador]

Rodolfo Delfini Cançado

Simone Cristina Olenscki Gilli

Data de defesa: 12-11-2019

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-3119-7996>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7710840260839328>

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

ALVARO HENRIQUE JUNQUEIRA TAVARES

ORIENTADOR: PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

MEMBROS:

1. PROF. DR. KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

2. PROF. DR. RODOLFO DELFINI CANÇADO

3. PROFA. DRA. SIMONE CRISTINA OLENSCKI GILLI

Programa de Pós-Graduação em [PROGRAMA] da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros da banca examinadora encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

Data: DATA DA DEFESA 12/11/2019

AGRADECIMENTOS

Me lembro da primeira reunião com o Kleber, ainda na especialização, onde eu tinha apenas a ideia de pesquisar algo dentro de metabolismo do ferro e ele me abriu uma imensidão de possibilidades. De orientador a amigo, Kleber sempre me encorajou e me incentivou a alçar voos que jamais imaginei que poderia enfrentar. Obrigado, Kleber, por todos os ensinamentos que vão muito além do conhecimento que está nessa dissertação, sempre será um privilégio conviver com você e te ver pensar.

Agradeço também a minha família, meu pai Ronan, minha mãe Silvana e meu irmão Pedro, meu primo Wilmar e sua família, por me incentivarem a seguir os meus sonhos e por estarem ao meu lado nos momentos em que mais precisei, a vocês, minha grande admiração.

Angélica, minha companheira, agradeço por seu apoio incondicional, por me guiar nos momentos onde perdi minha lucidez e por sempre me fazendo lembrar o propósito que me moveu até aqui. Obrigado por me acompanhar na reta final dessa jornada e por sua resiliência. Ao lado de todo grande homem, existe sempre uma grande mulher.

A alguns amigos em especial: Douglas, Fábio, Felipe, Helder e Roger. Sempre serei grato por ter vocês em minha vida, saibam que seria impossível descrever o que sou sem citar individualmente cada um de vocês.

Meu muito obrigado ao médico Marcos Megda e a toda equipe da Prevent por terem me acolhido sempre que necessitei, permitindo que eu pudesse continuar trilhando o caminho que me trouxe até aqui, serei sempre muito grato a todos vocês.

Agradeço também o companheirismo do dia a dia de todos os colegas de laboratório, Isa, Marinas, Letícia, Athos, Felipe e Hanan; as alunas da professora Nicola Conran, os alunos do professor Fernando Costa, os alunos da professora Fátima Sonati. Aos colaboradores do laboratório, Fábio, Carol, Dul, Boca, Carla e Ucha, por todo o suporte técnico e científico durante a elaboração desse trabalho. Ao professor Fernando Ferreira Costa, por dispor de espaço físico, de apoio financeiro e intelectual nesse projeto. Também agradeço ao Dr. Otávio Filho, do serviço de imagem do hospital de clínicas da Unicamp, por colaborar com o nosso trabalho.

Agradeço também a todos os pacientes que foram selecionados para essa pesquisa, eles são a força motriz pela qual esse estudo foi impulsionado. Também gostaria de agradecer a todos os funcionários do ambulatório de hemoglobinopatias do hemocentro, sobretudo a enfermeira Elaine, Dra. Simone e Dr. Bruno.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos docentes e funcionários do laboratório de patologia clínica e do hemocentro, por sempre estarem dispostos a auxiliar e a ensinar. Acredito que um profissional, na essência da palavra, é aquele que tem a habilidade de agregar conhecimento de várias fontes, mas que também saiba transmiti-lo sem restrições a todos que os acompanham. Vocês foram essas pessoas e fizeram de mim um profissional melhor.

A professora Célia Garlipp, por todos os ensinamentos durante a minha trajetória nessa instituição, de aluno de especialização a PED. Célia é um exemplo de profissional, a qual irei espelhar-me com muito orgulho durante toda a minha carreira profissional. Aproveito para agradecer também todos os professores e alunos que participaram da disciplina FR155 nos anos de 2017 e 2018, pois com o auxílio de todos vocês pude reafirmar em mim a certeza de ser professor.

Agradeço a Deus pelo dom da vida, por poder ser apto a aprender e a agregar todo o conhecimento que levou à conclusão desse trabalho. A Ele, dou graças por tudo que tenho.

Um agradecimento especial para a Unicamp, uma instituição de ensino que abraça seus estudantes e nos dá a oportunidade de entender o mundo de várias perspectivas. Aqui, pude me tornar uma pessoa melhor, que entende e respeita as diferenças, convivendo de forma pacífica com tudo aquilo que difere de mim. Obrigado a todas as pessoas com quem tive contato durante esses anos de Unicamp, pude aprender muito com cada um, seja em breve segundos ou em uma longa convivência.

Em alguns momentos, precisamos encontrar forças para sermos maiores que as muralhas que nos separam de nossos sonhos. Na escuridão dos dias atuais, o conhecimento é a claraboia que nos faz enxergar um lampejo de esperança, nos trazendo significado à vida. Tudo começou com um sonho, se transformou em um propósito para virar a realidade dessa dissertação.

RESUMO

Pacientes com hemoglobinopatias podem necessitar de transfusões, o que pode levar a sobrecarga de ferro. O exame de ressonância magnética (RM) pela sequência de T2* é um método não invasivo, sensível e específico para medir a concentração de ferro hepática (LIC) e a concentração de ferro miocárdica (MIC), mas não é tão disponível em países em desenvolvimento onde a doença falciforme (DF) e a talassemia (TAL) são mais prevalentes, quanto os exames de bioquímica tradicionais. O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar sobrecarga de ferro em pacientes com DF e TAL em seguimento no Hemocentro Campinas avaliados tanto com exames tradicionais de bioquímica (ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação ao ferro – TIBC, e índice de saturação de transferrina – IST) e hemograma completo, quanto com LIC e MIC medidos por RM, e estudar as correlações entre essas medidas. Analisamos dados de pacientes avaliados entre abril de 2014 a dezembro de 2018. Os dados foram obtidos a partir dos sistemas informatizados do serviço de Ressonância Magnética, Hemocentro Campinas e do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Foram incluídos dados de 36 pacientes (25 com DF e 11 com TAL). Sobrecarga de ferro hepática foi encontrada em 23 (92%) pacientes com DF e em 10 pacientes (90%) com TAL. Dois pacientes com TAL apresentaram sobrecarga de ferro miocárdica e foi identificado um caso de sobrecarga de ferro cardíaca grave com desfecho fatal em um paciente com DF. Uma revisão sistemática da literatura mostrou que essa complicação rara está possivelmente associada com alto volume transfusional e má adesão a terapia de quelação de ferro. Em relação aos exames da população do estudo, a ferritina sérica se correlacionou com LIC ($r=0.59$, $P<0.0001$) e com o T2* cardíaco ($r=-0.44$, $P<0.0001$). As análises por curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) mostraram que um valor de corte da ferritina de 562 ng/mL teve uma sensibilidade de 93,5% e uma especificidade de 88,9% para identificar a presença de sobrecarga de ferro hepática. Um índice de saturação de transferrina de 95,4% identificou a presença de sobrecarga cardíaca com sensibilidade de 42,9% e especificidade de 96,5%. A análise de um subgrupo de pacientes com mais de um exame de RM nos permitiu determinar que a variação da ferritina se correlacionou melhor com mudanças no LIC em pacientes com DF, enquanto a variação do TIBC se correlacionou com mudanças no T2* em pacientes com TAL. Isso sugere que observar a tendência da ferritina ou do TIBC pode ser útil em decidir antecipar ou postergar exames de RM durante o tratamento desses

pacientes. Nossos dados concordam com a literatura publicada, mostrando diferenças no padrão de sobrecarga de ferro entre pacientes com DF e TAL, e sugere que, em locais em que há acesso limitado a RM, exames laboratoriais podem ser úteis para otimizar a indicação de RM para diagnóstico e monitoramento de sobrecarga de ferro transfusional em pacientes com hemoglobinopatias.

Palavras-chave: Ferritina, anemia falciforme, talassemia, quelação de ferro.

ABSTRACT

Patients with hemoglobinopathies may need transfusions, which may lead to iron overload (IO). Magnetic resonance imaging (MRI) using T2* is a noninvasive, sensitive and specific method for measuring liver iron concentration (LIC) and myocardial iron concentration (MIC) but is not as available as more traditional biochemical tests in developing countries where sickle cell disease (SCD) and thalassemia (THAL) are more prevalent. The aim of this study was to evaluate and compare IO in patients with SCD and THAL under follow-up at Hemocentro Campinas - UNICAMP, as evaluated with traditional biochemical tests (serum ferritin, serum iron, total iron binding capacity - TIBC, and transferrin saturation index - TSI) and LIC, cardiac T2*, and MIC as measured by magnetic resonance imaging, and to study the correlations between the obtained measurements. From April 2014 to December 2018, data from 36 patients (25 with SCD; 11 with THAL) were collected. Liver IO defined by LIC > 2mg/g was detected in 23 (92%) of SCD patients and in 10/11 (90%) in the THAL group. Two patients from the THAL group had cardiac iron overload, and we identified one case of severe cardiac IO with a fatal outcome in the SCD group. A systematic review showed that this rare complication in SCD may be associated with high transfusion burden and poor adherence to iron chelation therapy. Regarding the lab and imaging tests, serum ferritin correlated with LIC ($r = 0.59$ $P < 0.0001$) and cardiac T2* ($r = -0.44$, $P < 0.0001$). Analyses using the receiver operator characteristic curves (ROC) showed that a ferritin cut-off value of 562ng/mL had a sensitivity of 93,5% and a specificity of 88,9% of predicting a LIC above 2mg/g, and a TSI value of 95,4% had 42,9% sensitivity and 96,5% specificity to detect T2* below 20ms. A subgroup analysis of patients with more than one MRI scan allowed us to evaluate whether variations between paired measurements of laboratory and imaging tests were correlated. Ferritin variation correlated better with differences in LIC in patients with SCD, while TIBC variation correlated with T2* in the THAL population. This suggests that observing the trend of ferritin or TIBC may be helpful to decide to anticipate or postpone MRI scans during the treatment of those patients. Our data agree with published literature showing differences in the pattern of iron overload between patients with SCD and THAL, and suggest that, in places with limited access to MRI, laboratory tests may be useful to optimize MRI indication to diagnose and monitor transfusion iron overload MRI.

Keywords: Ferritin, sickle cell anemia, thalassemia, iron chelation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1. Metabolismo do ferro	13
1.1.1. Aquisição de ferro	13
1.1.2. Absorção do ferro	14
1.1.3. Transporte do Ferro	15
1.1.4. Estoque de Ferro	16
1.1.5 Reciclagem do ferro	16
1.2. Hemoglobinopatias	18
1.2.1. Doenças Falciformes	18
1.2.2. Histórico e prevalência da doença	18
1.2.3. Fisiopatologia das doenças falciformes	19
1.3. Talassemias	21
1.4. Sobrecarga de ferro transfusional	23
1.5. Avaliação da sobrecarga de ferro	24
1.6. Tratamento da sobrecarga de ferro em pacientes com hemoglobinopatias	25
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Geral	26
2.2. Específicos	26
3. Materiais e Métodos	27
3.1. Tipo de Estudo	27
3.2. Coleta de dados.....	27
3.3 Critérios de inclusão	28
3.5 Critérios de exclusão	28
3.6. Aspectos éticos	28
3.7. Tabulação e Análise Estatística	28
4. RESULTADOS.....	29
4.1. Manuscrito publicado no periódico <i>Transfusion Medicine Reviews</i>.....	31

4.2	Manuscrito em elaboração	35
	CONCLUSÃO:	62
5.	DISCUSSÃO GERAL	65
6.	CONCLUSÕES	67
7.	REFERÊNCIAS	68

1. INTRODUÇÃO

O ferro é um metal essencial ao organismo por estar envolvidos em vários processos fisiológico, sobretudo na constituição de metaloproteínas como a hemoglobina (1).

A hemoglobina é uma metaloproteína tetramérica composta por quatro cadeias globínicas e quatro grupamentos heme, sendo que cada um desses possui um átomo de ferro. Há diversos tipos de cadeias que compõem a porção globínica nas diferentes fases do desenvolvimento, desde o embrião, passando para a fase fetal, e por fim, a partir do sexto mês após o nascimento, a hemoglobina é majoritariamente formada por duas cadeias do tipo α e duas do tipo β . Independentemente dessa variação de constituição, o papel essencial da hemoglobina no transporte de gases como o oxigênio e o dióxido de carbono é constante e imutável (2).

As hemoglobinopatias são doenças genéticas relacionadas à hemoglobina, e um dos tratamentos empregados é a transfusão de concentrado de hemácias (3). A terapia transfusional pode levar ao acúmulo de ferro em diversos órgãos, tais como o coração e o fígado, podendo levar a sua falência (4). O conhecimento dos mecanismos envolvidos no metabolismo do ferro no corpo humano é fundamental para se entender como acontece o acúmulo desse metal no organismo.

1.1. Metabolismo do ferro

1.1.1. Aquisição de ferro

Estima-se que o corpo humano utilize cerca de 20 a 30mg de ferro por dia, sendo que o estoque corporal é de 3 – 4g em homens e 2,5g em mulheres (1) (5). As recomendações do *Dietary Reference Intake* de 2001, que ainda são utilizadas conforme documento de 2017 (6), apontam que o consumo de ferro ideal por dia é de 8mg para homens e mulheres pós menopausa, sendo que não há um valor de consenso para mulheres em idade fértil (5). Apesar dessa quantidade de ferro ingerida, a absorção varia de cada grupo, sendo que homens absorvem cerca de 1mg por dia, enquanto em mulheres em idade fértil

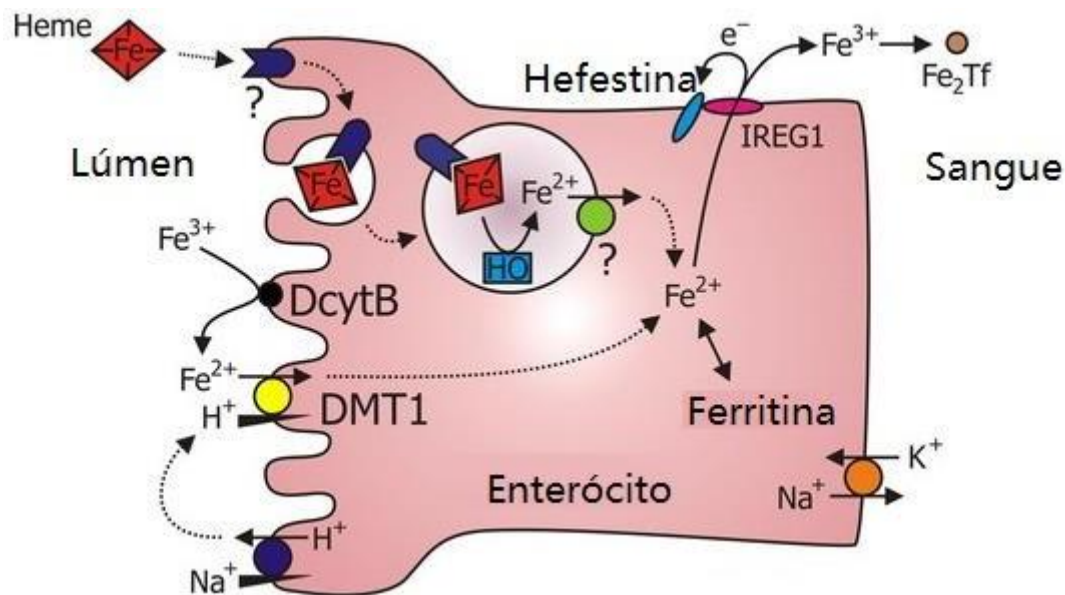
a absorção pode variar de 1,5mg a 3,4mg por dia (5). A diferença entre a quantidade de ferro absorvida frente a quantidade de ferro utilizada é suprida pelo mecanismo de reutilização do grupamento heme oriundo da hemocaterese.

A aquisição de ferro pelo organismo se dá através da alimentação, sendo que, devido a capacidade deste elemento em ganhar e perder elétrons, pode ser encontrado sob duas formas a depender da ação de agentes oxidantes ou agentes redutores. O ferro ferroso (Fe^{2+}) é o constituinte do grupamento heme e, por essa razão, pode ser encontrado em carnes e peixes enquanto o ferro férrico (Fe^{3+}) é encontrado em hortaliças de folha cor verde-escura, e no organismo humano estão estocados ligados a ferritina ou a hemossiderina, em órgão como o fígado e na medula óssea (7).

1.1.2. Absorção do ferro

Em 1997, foi descoberto por Gunshin e colaboradores um novo transportador de ferro usando o sistema de expressão dos oocistos de *Xenopus laevis* (8) e por Romero e colaboradores que descreveram uma glicoproteína transmembrana transportadora de cátion divalente (9). Como o próprio nome sugere, esse receptor consegue realizar a internalização de metais divalentes, como o ferro ferroso, o cálcio e o magnésio, por exemplo (10). Por esta razão, o ferro férrico sofre a ação de redução para a forma ferrosa através citocromo B duodenal (DcytB), descrito em 2001 por McKie e colaboradores, para que então possa ser internalizado via DMT1 (10, 11). O hidrogênio provê um gradiente eletroquímico suficiente para que ocorra a acidificação do meio e a consequente internalização do ferro via DMT1 (12). No citoplasma do enterócito duodenal, o ferro ainda sob a forma ferrosa pode, a depender da necessidade corporal, ser estocado ligado à ferritina na própria célula ou externalizado para a corrente sanguínea (12). A hefestina, descrita por Vulpe e colaboradores em 1999 (13), é uma enzima que oxida o ferro ferroso transformando-o em ferro férrico para que, através da proteína transmembrânica ferroportina (também conhecida como IRGE1, do inglês *iron-regulated transporter 1*), seja exportado para ser ligado à transferrina (12). A figura 1 ilustra o mecanismo de absorção do ferro pelo enterócito duodenal.

Figura 1. Absorção do ferro no enterócito duodenal.



Esquema da absorção do ferro pelo enterócito. O Ferro 3^+ é reduzido para Ferro 2^+ pela ação do citocromo duodenal B (DcytB). Após, é internalizado por meio do receptor de metal divalente 1 (DMT1), sendo sua absorção facilitada pela diminuição do pH no lúmen pela ação do hidrogênio. Uma vez internalizado, é estocado ligado à ferritina ou é oxidado para a forma 3^+ pela ação da hefestina para ser ligado à transferrina (14).

1.1.3. Transporte do Ferro

A transferrina é uma proteína com dois sítios específicos de ligação ao ferro férrico descoberta em 1947 por Holmberg & Laurell, capaz de transportar o ferro pela circulação sem que haja dano oxidativo causado pelo mesmo (15). Os receptores da transferrina, chamados de TFR1 e TFR2 foram descobertos em diferentes épocas e, por essa razão, a função do TFR1 é amplamente mais conhecida que a do TFR2 (16, 17). O papel mais reconhecido do TFR1 é proporcionar a internalização do complexo ferro-transferrina no precursor eritróide para que o ferro seja utilizado no processo de síntese da hemoglobina (18). O TFR2 é expresso predominantemente na superfície de precursores eritróides e no fígado, sendo que nesse último atua como um sensor que reflete os níveis de ferro corporal (19). Dentre as diferenças destes dois receptores, sabe-se que a ligação da Transferrina se dá por maneiras diferentes em ambos os receptores e que o TFR2 facilita a entrega do ferro à mitocôndria (17, 20).

1.1.4. Estoque de Ferro

Após ser ligado à transferrina, o ferro pode ser direcionado tanto para o uso, quanto para o estoque, sendo que nesse último, pode ser encontrado de duas formas: ligado à ferritina ou à hemossiderina (1). Em 1937, Laufberger isolou do baço de cavalos a ferritina, que continha cerca de 23% do peso de ferro seco do animal (21, 22). Apenas depois de algumas décadas, a ferritina foi descrita no sangue humano (23). Essa proteína é capaz de ligar até 4500 átomos de ferro, e é constituída por 24 subunidades de dois tipos, conhecidas como H e L, sendo a subunidade H com padrão de migração eletroforético mais pesado do que a subunidade L (21). Há de se destacar o papel da ferritina em situações inflamatórias, em que sua produção é aumentada para sequestrar o ferro sérico e diminuir sua disponibilidade para o metabolismo de agentes infecciosos, tais como bactérias, ou de células tumorais (21, 24).

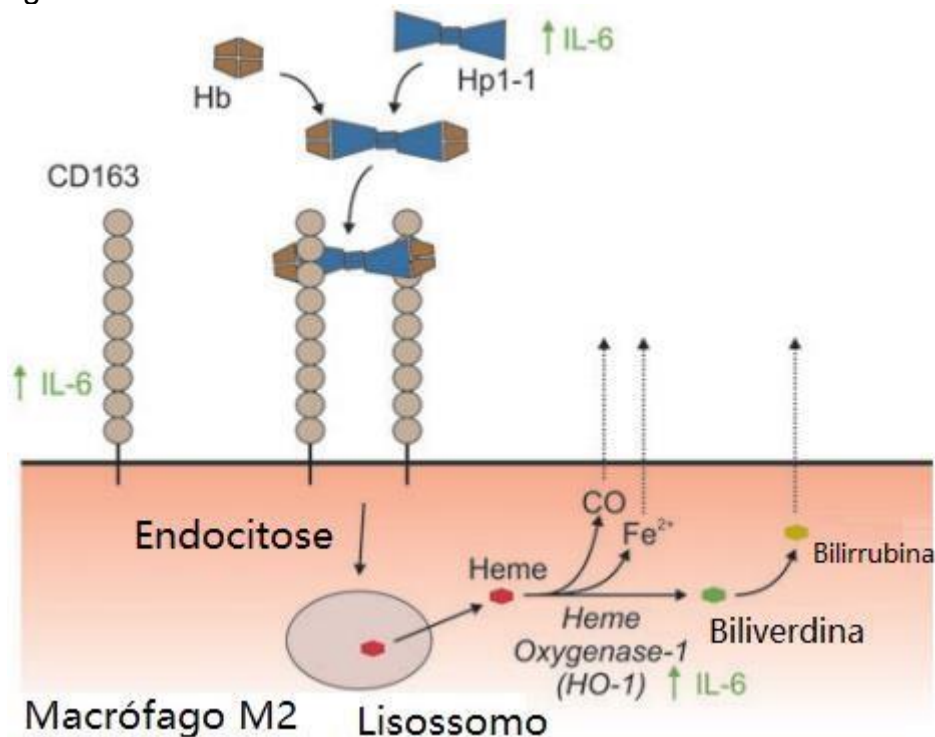
1.1.5 Reciclagem do ferro

Após 120 dias em circulação, as hemácias passam por um processo de hemocaterese, que ocorre por sua destruição nos macrófagos, que fagocitam os eritrócitos senescentes. A hemoglobina é extraída dos glóbulos vermelhos e degradada pela enzima heme oxigenase para liberação do ferro contido em cada grupamento heme. Esse ferro é então exportado pelos macrófagos para retornar aos eritroblastos da medula óssea para síntese de novas moléculas de hemoglobina.

Além do processo fisiológico de hemocaterese, as hemácias podem sofrer hemólise, e a degradação da hemoglobina liberada depende de uma proteína chamada haptoglobina. A haptoglobina foi descoberta em 1938 como uma abundante glicoproteína de fase aguda inflamatória (25). Em condições de hemólise, a hemoglobina é liberada do interior dos eritrócitos ainda na luz do vaso sanguíneo, podendo causar danos oxidativos e, para evitar tal consequência, a haptoglobina forma um complexo com a hemoglobina livre que será reconhecido por receptores específicos na superfície de macrófagos, tais como o CD163 (25-27). A figura a seguir representa o processo de reciclagem

do ferro no interior do macrófago após a aquisição de hemoglobina ligada a haptoglobina.

Figura 2. Internalização do complexo hemoglobina-haptoglobina pelos macrófagos.



Após ligado, o complexo hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp) é reconhecido pelo receptor CD163 presente na superfície dos macrófagos do tipo M2, encontrados no fígado, na medula óssea, no baço e em sítios inflamatórios, que realizam a sua internalização. No citoplasma, o complexo é degradado, o heme é liberado, e a Heme oxigenase-1 (HO1) o converte em biliverdina para posteriormente ser liberado em bilirrubina pela ação da biliverdina redutase. Todo esse caminho é regulado positivamente pela interleucina-6 e, por isso, acredita-se que os metabólitos do heme como o monóxido de carbono possuem potencial anti-inflamatório (25).

Outro mecanismo pelo qual é possível reciclar o ferro é através da hemopexina (Hpx), uma proteína de fase aguda inflamatória expressa no fígado capaz de se ligar ao grupamento heme (28). O heme é liberado livre em circulação após degradação de moléculas livres de hemoglobina. Quando a hemopexina liga o grupamento heme presente na circulação, acontece a formação do complexo heme-hpx que é reconhecido pelo receptor CD91, também chamado de LRP1 (29, 30). Após a internalização, o heme é liberado no citoplasma para ser degradado pela ação da HO1 (31).

1.2. Hemoglobinopatias

1.2.1. Doenças Falciformes

Doenças falciformes são enfermidades causadas pela presença de uma mutação de ponto no gene *HBB* que codifica a globina beta, levando a uma substituição de uma adenina por uma tirosina no vigésimo nucleotídeo, resultando na troca de um resíduo de ácido glutâmico por uma valina [HBB:c.20A>T (p.Glu6Val)]. Denomina-se anemia falciforme (AF) a DF em que essa mutação está presente em homozigose, enquanto nas demais DF, a mutação está em heterozigose associada outras mutações que afetam o outro alelo do gene da globina beta, como ocorre nas S-beta talassemias, por exemplo (32).

1.2.2. Histórico e prevalência da doença

Em 1910, o médico americano James B. Herrick's relatou o caso de um jovem que apresentava anemia com eritrócitos com formato "peculiar", sendo este o primeiro relato de anemia falciforme (AF) da literatura (33, 34). Em 1927, Hahn e Gillespie sugeriram que a causa da deformação do eritrócito era a hipóxia, sendo demonstrada por um experimento no qual os eritrócitos foram saturados com uma suspensão contendo dióxido de carbono (35, 36). Em 1940, Sherman percebeu uma birrefringência de eritrócitos desoxigenados, sugerindo que baixa oxigenação acarretava uma alteração estrutural da molécula de hemoglobina (37, 38). Em 1948, Dr. Janet Watson observou que recém-nascidos com altos índices de hemoglobina Fetal (HbF) não demonstravam sintomas, diferentemente dos adultos que possuem níveis maiores de hemoglobina A (HbA). Assim, foi sugerido que a HbF teria um papel protetor na fisiopatologia da anemia falciforme (39, 40). No mesmo ano, Linus Pauling e colaboradores, através do advento da eletroforese de proteína, descobriram que a hemoglobina dos pacientes com doença falciforme era diferente da hemoglobina dos pacientes sem a patologia, caracterizando assim a descoberta da primeira doença em que a alteração na proteína era a causa da patologia (41, 42). Em 1956, Ingram e Hunt descreveram diferenças químicas específicas entre as

globinas de pacientes sadios e de pacientes com anemia falciforme. (43-45). Em 1984, foi realizado o primeiro transplante em um paciente com anemia falciforme e leucemia aguda, resultando no processo curativo da doença, o que abriu uma nova perspectiva para os portadores dessa patologia (46, 47). Em 1995, através de estudo multicêntrico sobre o uso de Hidroxiureia (HU) em pacientes com AF, concluiu-se que essa droga melhora a qualidade de vida do paciente dada a elevação os níveis de HbF (48, 49).

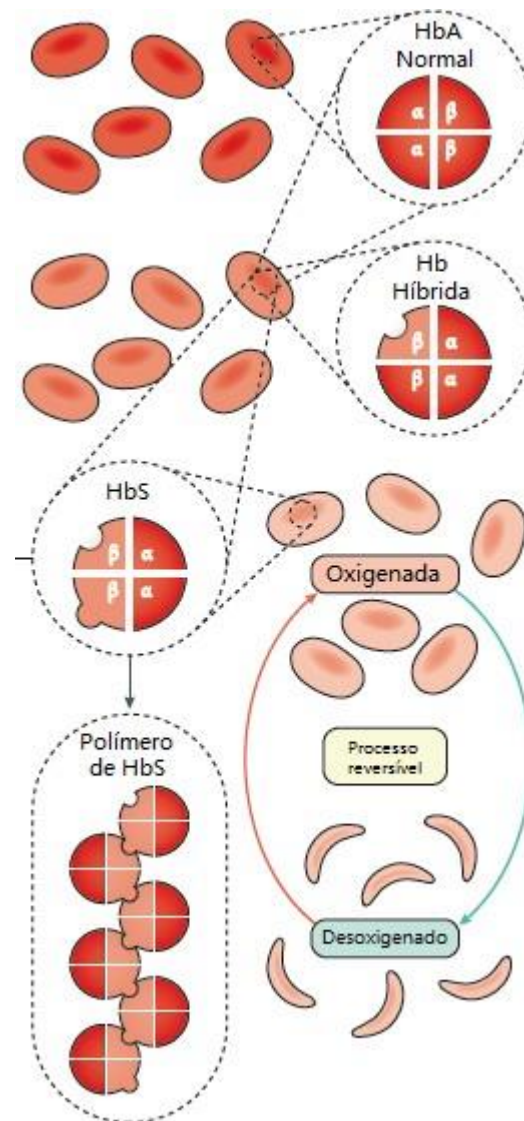
Estima-se que a anemia falciforme atinge cerca de 400.000 recém-nascidos, sendo 13 milhões de portadores no mundo, tornando-se assim um problema de saúde pública global (50, 51). No Brasil, cerca de 25.000 a 30.000 pessoas possuem doença falciforme e 7 milhões de pessoas são portadoras do gene, gerando 3.500 recém-nascidos por ano com doença falciforme (52).

Lervolino e colaboradores conduziram um estudo em 2011 para avaliar a prevalência da doença falciforme no Brasil, onde realizaram a análise de 20 artigos nacionais e encontraram dados de vários estados do país, com variações de 1,1% a 9,8% de nascidos portadores do traço falciforme e 0,8 a 60 em cem mil recém-nascidos com a doença no país (53). Ainda no âmbito nacional, a prevalência das causas de mortalidade nos pacientes com anemia falciforme foi atribuída à infecções, sequestro esplênico agudo de eritrócitos e síndrome torácica aguda.(54). Em Minas Gerais, 3,6 milhões de recém-nascidos foram avaliados no período de 14 anos até 2012, sendo 2.591 diagnósticos de SCD, resultando em uma prevalência de 1:1.400 e 7,4% de mortalidade. O mesmo estudo conclui que as principais causas de óbito foram síndrome torácica aguda (36.8%), sepse (31.6%) e sequestro esplênico de eritrócitos (55). Em Campinas, a cada 5527 nascimentos ocorria um caso de doença falciforme com significância clínica (56).

1.2.3. Fisiopatologia das doenças falciformes

O principal evento fisiopatológico nas doenças falciformes é a polimerização da HbS em condições de baixas tensões de oxigênio e acidose, causando anemia hemolítica que diminui em cerca de 75% o tempo de vida dos eritrócitos (57-59). Esse processo está representado na figura 3.

Figura 3. Fisiopatologia da anemia falciforme. Sob baixas tensões de oxigênio, acontece a polimerização da HbS que acarreta na alteração do formato da hemácia, além de aumentar a adesão entre as hemácias podendo levar a crises vaso-oclusivas (60).



Alguns fatores contribuem para a diminuição da afinidade pelo oxigênio da HbS quando comparada com a HbA, como a mutação inerente à doença que acarreta a polimerização da cadeia globínica e o aumento da concentração intracelular de 2,3-difosfoglicerato por interagir com subunidades desoxigenadas de globina β (61, 62). Esta redução de afinidade pelo oxigênio é fator predominante para a polimerização da hemoglobina, que modifica a conformação do eritrócito. Essa

alteração é responsável pelo nome da doença, já que o eritrócito adquire a conformação de “foice”, (ou cientificamente drepanócito) (60, 63). O processo de “falcização” acontece repetidas vezes até que se torna irreversível. O eritrócito perde a capacidade de deformabilidade da membrana e não consegue atravessar a microcirculação esplênica, onde os macrófagos do sistema retículo endotelial fagocitam essas células, causando uma diminuição no número de eritrócitos e consequente anemia hemolítica (64-66).

As complicações relacionadas à anemia falciforme podem ser divididas entre agudas e crônicas. Dentre as complicações agudas, o acidente vascular encefálico possui incidência de um em cada quatro pacientes AF com até 45 anos de idade (60, 67). O acidente vascular encefálico geralmente decorre do evento oclusivo em uma artéria cerebral de importante calibre e pode se manifestar como um evento isquêmico transitório, fraqueza súbita ou perda de consciência (60). Outra complicação grave é a síndrome torácica aguda, que tem como causas mais comuns a infecção e a embolia gordurosa(68). O desenvolvimento da síndrome torácica aguda é multifatorial, tendo início com a polimerização da HbS pela hipóxia, aumentando a expressão das moléculas de adesão, levando a dano endotelial, que por sua vez aumenta os mediadores inflamatórios e ocasiona a diminuição de óxido nítrico (68-71). Os pacientes com AF apresentam crises vaso oclusivas que podem levar à eventos como acidente vascular cerebral ou a síndrome torácica aguda.(60, 72, 73). A terapia transfusional é uma alternativa para tratar e evitara recorrência das complicações acima mencionadas, reduzindo os níveis de HbS e a incidência de eventos vaso-oclusivos (74).

1.3. Talassemias

A palavra talassemia vem do grego *thalassa* (mar) e *haima* (sangue), devido a então conhecida alta incidência na população do Mar Mediterrâneo (75). Em 1925, o médico americano T.B. Cooley publicou um estudo de uma criança italiana com quadro de anemia grave, baixo crescimento

e alterações no tamanho dos órgãos abdominais, evoluindo para óbito precoce, ainda na primeira infância (76). Em 1936, Bradford e Whipple associaram pigmentações encontradas em cinco casos de autópsias, que possuíam características de hemocromatose, à talassemia (77). Em 1946, a causa da talassemia foi associada a anormalidade estrutural da hemoglobina (78). Nos anos 60, a terapia transfusional começou a ser adotada em conjunto com a esplenectomia, pois aumentava a sobrevivência dos eritrócitos transfundidos, diminuindo a quantidade de transfusão e melhorando a qualidade de vida dos pacientes (79). Há quase 40 anos, foi realizado o primeiro transplante de medula óssea em um paciente portador de talassemia.

A patogênese da talassemia se baseia no desequilíbrio de produção das cadeias globínicas, sendo os tipos mais comuns os que afetam ou a produção de cadeias alfa ou de cadeias beta, conforme demonstrado na figura 4.

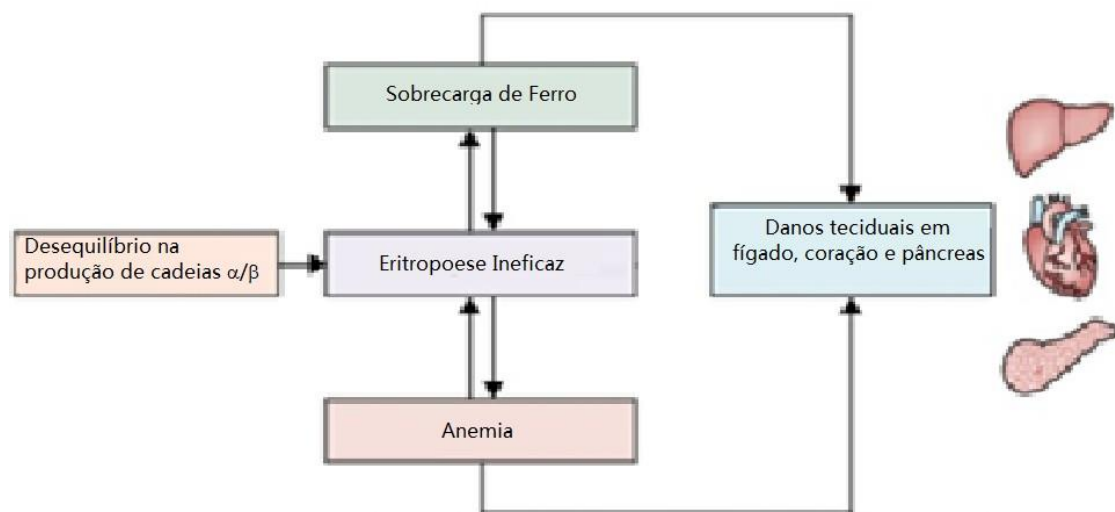


Figura 4. Fisiopatologia das Talassemias

Devido as alterações genéticas da talassemia, há o desequilíbrio na produção de cadeias α e β , que levam à eritropoese ineficaz. Como consequência, esse evento acarreta em anemia microcítica e hipocrômica, além de sobrecarga de ferro. Esse conjunto de eventos proporcionam danos teciduais, sendo que no acometimento

sistêmico da patologia, os órgãos mais afetados, principalmente pela sobrecarga de ferro, são o fígado, o coração e o pâncreas (80).

A talassemia alfa é mais frequentemente ocasionada por deleções no cluster do gene da globina alfa, que acarreta na diminuição ou na inexistência de produção de cadeias alfas, causando um acúmulo de cadeia beta, propiciando, em sua forma intermediária, com deleção de 3 dos 4 genes alfa, o aparecimento da hemoglobina H, e na ausência completa de genes alfa, a síndrome de hidropsia fetal da hemoglobina Barts (80). Já a talassemia beta é mais frequentemente ocasionada por mutações de ponto no gene da globina beta, que reduzem ou abolem completamente a produção de cadeias beta, com acúmulo de cadeias alfa nos precursores eritróides e consequente morte precoce dessas células, processo chamado de eritropoese ineficaz (80).

Dentre as manifestações clínicas das formas graves de talassemia, a anemia microcítica ocasionada pela eritropoese ineficaz é característica e, muitas vezes, o achado inicial que leva ao diagnóstico da doença. Contudo, pacientes com talassemia também podem apresentar anomalias de crescimento ósseo devido à tentativa de compensação da hematopoese. Essa situação também pode levar à hepatomegalia e esplenomegalia, que contribuem para a detecção da doença. Uma das principais complicações das talassemias é o acúmulo de ferro primário ocasionado pelo aumento da sua absorção intestinal, em resposta à anemia crônica, que ocorre mesmo nos pacientes que não recebem transfusão (80).

A exemplo da doença falciforme, a terapia transfusional também é empregada nas talassemias, o que acarreta acúmulo de ferro tecidual adicional e se torna a principal complicação do tratamento das formas mais graves de talassemia, tais como as talassemias beta maiores.

1.4. Sobrecarga de ferro transfusional

A exemplo do que ocorre com as hemácias endógenas, as hemácias provenientes de transfusão também passam pelo processo de hemocaterese e liberam o ferro contido no grupamento heme da molécula de

hemoglobina. Como descrito anteriormente, o corpo não possui mecanismo fisiológico para excretar o ferro em excesso e, assim, o ferro se acumula inicialmente no baço e fígado, órgãos fisiologicamente responsáveis pela estocagem de ferro. Com o acúmulo progressivo através de transfusões sucessivas, o ferro em excesso passa a se acumular em outros órgãos, tais como o pâncreas, glândulas endócrinas e coração. A siderose grave pode mais tarde causar complicações que vão de disfunções desses órgãos acometidos, tais como cirrose hepática, diabetes mellitus e insuficiência cardíaca, até processos carcinogênicos, como a ocorrência de carcinoma hepático (81).

1.5. Avaliação da sobrecarga de ferro

A avaliação da sobrecarga de ferro pode ser realizada através de exames bioquímicos e também por exames de ressonância magnética. Os exames bioquímicos incluem as dosagens de ferritina, ferro sérico, índice de saturação da transferrina (IST) e pela capacidade total de ligação ao ferro (*total iron binding capacity*, TIBC).

Os valores de ferritina e de ferro são dosados diretamente no soro dos pacientes. O TIBC pode ser obtido através da soma do ferro sérico com a medida de UIBC (capacidade latente de ligação ao ferro, ou seja, a quantidade de ferro que a transferrina ainda teria capacidade de ligar). Além disso, pode ser obtida através da seguinte equação: concentração de transferrina (mg/L) x 0.0025. O IST também é obtido através de cálculo, sendo este o produto do quociente entre ferro sérico e TIBC. (82)

A ferritina, além de ser uma proteína que reflete o estoque do ferro no organismo, é uma proteína inflamatória de fase aguda, o que pode levar a altos valores deste analito no soro de pacientes em decorrência de processos que não sejam ligados ao metabolismo do ferro. O ferro sérico reflete os íons de ferro 3^+ que estão ligados à transferrina, enquanto o cálculo da saturação da transferrina reflete a quantidade de sítios desta proteína que estão ligados aos íons de ferro. Por fim, o TIBC reflete a quantidade íons de ferro que a transferrina é capaz de ligar. (82)

Antes do advento da RM, a biópsia hepática era utilizada para quantificar o estoque de ferro presente no fígado do paciente. Descrito pela primeira vez em 2005 por St. Pierre, o uso da RM na avaliação de sobrecarga de ferro é o exame de imagem mais sensível e específico para demonstrar o acúmulo hepático e para acompanhamento de pacientes submetidos a tratamento (83). A partir do desenvolvimento da sequência T2*, que permite avaliar o conteúdo de ferro tecidual sem a necessidade de biópsia, a RM passou a ser a primeira opção aos pacientes, sobretudo por ser uma forma menos invasiva de quantificar o ferro presente no fígado, e que ainda permite a avaliação de órgãos antes raramente ou nunca biopsiados, tais como pâncreas e coração. (82) A alteração demonstrada na RM consiste na redução da intensidade do sinal. Essa perda de sinal se deve a grande susceptibilidade paramagnética da ferritina e dos cristais de hemossiderina, que contém Fe^{3+} , encurtando o tempo de relaxamento dos prótons adjacentes nos modos T1 e T2. O efeito paramagnético é mais perceptível em T2 ou T2*. Nas concentrações encontradas no fígado, predomina o encurtamento de T2* (84, 85).

Os pacientes podem ser classificados de acordo com a presença ou ausência de sobrecarga de ferro cardíaca ou hepática segundo os critérios aceitos internacionalmente, a saber:

Tabela 1. Classificação da sobrecarga de ferro

Tecido	Normal	Leve	Moderada	Grave
Fígado				
Conteúdo hepático de ferro (mg/g)	<2	2-7	7-15	>15
Miocárdio				
T2* cardíaco (ms)	>20	15-20	10-15	<10

Adaptado de (3,10).

1.6. Tratamento da sobrecarga de ferro em pacientes com hemoglobinopatias.

O tratamento da sobrecarga de ferro nos pacientes portadores de hemoglobinopatias é feito através da administração de medicamentos quelantes,

uma vez que eles não podem ser submetidos ao procedimento de sangria terapêutica dado o quadro anêmico. No Brasil, temos três quelantes em uso, sendo eles a deferoxamina, o deferiprone e o deferasirox. A deferoxamina foi o primeiro quelante utilizado e era administrado por veia subcutânea por infusão durante 8 a 12 horas (4). O deferiprone foi o primeiro quelante oral aprovado no Brasil, sendo que as doses variam de 75-100mg/Kg/dia, três vezes ao dia (86). Já o deferasirox foi o segundo quelante oral aprovado, administrado em uma única dose diária (87). Todos eles possuem efeitos adversos que reduzem a adesão ao tratamento, porém são as únicas opções disponíveis para tratamento de sobrecarga de ferro secundária à transfusão.

Embora o tratamento seja disponibilizado no Brasil gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde, o diagnóstico e monitoramento da sobrecarga de ferro com uso da RM ainda é difícil nos países em desenvolvimento devido à dificuldade no acesso ao exame, que é de alto custo e depende de treinamento específico e validação técnica para ser realizado corretamente. Assim, os exames laboratoriais ainda são os mais universalmente disponíveis para se fazer o diagnóstico de sobrecarga de ferro e seu monitoramento durante tratamento. Há a necessidade de se buscar maneiras de racionalizar o uso do exame de RM quando o acesso a ele é restrito, para otimizar esse tipo de avaliação em pacientes com maior prevalência e maior gravidade de sobrecarga de ferro tecidual.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar a importância das dosagens de marcadores de bioquímica na avaliação de pacientes com doença falciforme e talassemia acompanhados por sobrecarga de ferro com exame de ressonância magnética.

2.2. Específicos

- 1- Caracterizar a população de pacientes com doença falciforme e talassemia em acompanhamento no Hemocentro Campinas submetida a exame de ressonância magnética para avaliação de sobrecarga de ferro quanto a:
 - a. Índices hematimétricos (contagens de leucócitos, hemácias, plaquetas, medidas de hemoglobina, hematócrito [HCT], volume corpuscular médio [VCM]);
 - b. Dosagens de ferritina sérica, ferro sérico, TIBC e IST;
 - c. Presença e gravidade de sobrecarga de ferro utilizando conteúdo hepático de ferro (LIC), T2* cardíaco e conteúdo miocárdico de ferro (MIC) determinados por ressonância magnética;
 - d. Dados clínicos (transfusão, terapia quelante, uso de sangria terapêutica)
- 2- Analisar correlações entre os valores de dosagens bioquímicas e índices de RM e comparar seus resultados entre pacientes conforme tipo de hemoglobinopatia;
- 3- Determinar e correlacionar a variação de valores das dosagens bioquímica e dos índices de RM em pacientes com mais de um exame no período do estudo.

3. Materiais e Métodos

3.1. Tipo de Estudo

Este foi um estudo unicêntrico (Hospital de Clínicas, HC-UNICAMP) observacional retrospectivo transversal.

3.2. Coleta de dados

Foram coletados os dados clínicos (idade, sexo, diagnóstico hematológico, complicações associadas, terapia transfusional e terapia quelante), laboratoriais (índices hematimétricos, ferritina sérica, ferro sérico, IST) e de imagem (quantificação de conteúdo hepático de ferro e T2* cardíaco) dos sujeitos da pesquisa selecionados dentre os pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia, a partir de consulta aos prontuários médicos

impressos e/ou eletrônico e base de dados de exames laboratoriais da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP.

3.3 Critérios de inclusão

Para ser considerado elegível para o estudo, o sujeito deveria satisfazer todos os critérios de inclusão, a saber:

- a) Realização de pelo menos um exame de ressonância magnética hepática e cardíaca com cálculo de T2* hepático e cardíaco entre os anos de 2014 e 2018.
- b) Realização de pelo menos uma dosagem de todos os seguintes exames bioquímicos: ferritina, ferro sérico, IST e TIBC no mesmo período do exame de ressonância magnética

3.5 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes que não satisfizerem ambos os critérios de inclusão.

3.6. Aspectos éticos

A coleta de dados foi isenta da necessidade de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, número 1656762.

3.7. Tabulação e Análise Estatística

Os dados foram tabulados em planilha da plataforma Microsoft Excel e analisados em software GraphPad Prism 6.0. As variáveis quantitativas foram descritas como mediana, mínimo e máximo, e as variáveis qualitativas como porcentagem.

Características entre grupos com e sem sobrecarga de ferro foram comparadas por teste t de Student, ou teste de Wilcoxon quando apropriado para as variáveis quantitativas. O teste do qui quadrado ou o teste exato de Fisher foram utilizados para comparar variáveis qualitativas.

A partir dos dados de pacientes que apresentaram múltiplas avaliações por ressonância magnética, as comparações foram realizadas utilizando análises de regressão linear para avaliar a capacidade de cada variável laboratorial em prever mudança nas variáveis medidas por ressonância, tais como conteúdo de ferro hepático e cardíaco.

Os dados de exames laboratoriais também foram analisados quanto a sua sensibilidade e especificidade para sobrecarga de ferro utilizando curvas ROC (*receiver operating characteristic curve*).

4. RESULTADOS

Os resultados deste mestrado serão apresentados em forma de artigos científicos.

Artigo 1: MYOCARDIAL IRON OVERLOAD IN SICKLE CELL DISEASE: A RARE BUT A POTENTIALLY FATAL COMPLICATION. (publicado na revista Transfusion Reviews, em inglês)

Autores: Tavares, Alvaro Henrique Junqueira; Benites, Bruno Deltreggia; Fertrin, Kleber Yotsumoto.

Esse artigo foi elaborado a partir da identificação de um caso raro de sobrecarga de ferro cardíaca grave em um paciente com doença falciforme quando os dados de ressonância magnética foram compilados.

Artigo 2: IRON OVERLOAD IN PATIENTS WITH HEMOGLOBINOPATHIES IN SETTINGS WITH LIMITED ACCESS TO MAGNETIC RESONANCE. (em processo de elaboração, apresentado aqui em português)

Autores: Tavares, Alvaro Henrique Junqueira; Vendrame, Felipe; Benites, Bruno Deltreggia; Saad, Sara Therezinha Olalla, Coelho-Filho, Otávio Rizzi; Costa, Fernando Ferreira; Fertrin, Kleber Yotsumoto.

Esse artigo corresponde aos estudos referentes aos objetivos especificados anteriormente.

4.1. Manuscrito publicado no periódico *Transfusion Medicine Reviews*

ARTICLE IN PRESS

YTMRV-50572; No of Pages 6

Transfusion Medicine Reviews xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Transfusion Medicine Reviews

journal homepage: <https://www.journals.elsevier.com/transfusion-medicine-reviews/>

Clinical Trial

Myocardial Iron Overload in Sickle Cell Disease: A Rare But Potentially Fatal Complication of Transfusion

Alvaro Henrique Junqueira Tavares ^a, Bruno Deltreggia Benites ^a, Kleber Yotsumoto Fertrin ^{a,b,*}^a Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas – UNICAMP, Campinas, Brazil^b Division of Hematology, University of Washington, Seattle, WA

ARTICLE INFO

Available online xxxx

Keywords:

Iron overload
Sickle cell anemia
Magnetic resonance imaging
Ferritins
Cardiomyopathies
Thalassemia
Chelation therapy
Blood transfusion

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a frequent indication for chronic transfusion, which can cause iron overload. Excess iron often affects the liver, but not the heart in SCD. Magnetic resonance (MR) is recommended to detect myocardial iron overload (MIO) but its elevated cost requires optimized indication. We aimed to compile all published data on MIO in SCD upon the description of a fatal case of severe MIO in our institution, and to determine associated risk factors. We performed a systematic review using the PRISMA guidelines in two databases (PubMed and Web of Science). Inclusion criteria were publication in English, patients diagnosed with SCD, and reporting ferritin and MIO by MR. Twenty publications reported on 865 SCD adult and pediatric patients, with at least 10 other cases of MIO. The prevalence of MIO in chronically transfused SCD patients can be estimated to be 3% or less, and is associated with high transfusion burden, top-up transfusions, and low adherence to iron chelation. Cardiac siderosis in SCD is rarely reported, and increased awareness with better use of the available screening tools are necessary. Prospective studies should define the recommended chelation regimens depending on the severity of MIO.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Methods	0
Eligibility Criteria	0
Information Sources and Search Strategy	0
Study Selection	0
Data Collection Process and Data Items	0
Results	0
Case Report	0
Study Selection	0
Study Characteristics and Findings	0
Discussion	0
Summary of Evidence	0
Limitations	0
Conclusion	0
Acknowledgments	0
References	0

Abbreviations: SCD, sickle cell disease; MR, magnetic resonance; MIO, myocardial iron overload; TIBC, total iron binding capacity; TS, transferrin saturation; MIC, myocardial iron concentration; LIC, liver iron concentration.

* Corresponding author at: Kleber Y. Fertrin, MD, PhD, Department of Medicine, Division of Hematology, Box 358081, 1959 NE Pacific St., Seattle, WA, 98195-6410.

E-mail addresses: alvarohenriquevi@hotmail.com (A.H.J. Tavares), benites@unicamp.br (B.D. Benites), kleber@uw.edu (K.Y. Fertrin).

<https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.04.001>

0887-7963/© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cardiac involvement by iron overload is a possible complication of transfusion therapy [1,2]. Currently, it is recommended that patients on chronic transfusion undergo magnetic resonance (MR) with calculation of T2* for the evaluation of liver and myocardial iron concentrations (LIC and MIC, respectively) at least annually, and measurement of so-called “iron studies”, such as serum iron, ferritin, total iron binding

Please cite this article as: A.H.J. Tavares, B.D. Benites and K.Y. Fertrin, Myocardial Iron Overload in Sickle Cell Disease: A Rare But Potentially Fatal Complication of Transfusion, *Transfusion Medicine Reviews*, <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.04.001>

ARTICLE IN PRESS

2

A.H.J. Tavares et al. / *Transfusion Medicine Reviews xxx (xxxx) xxx*

capacity (TIBC) and transferrin saturation (TS) is also recommended at least every 3 months [3–5]. Differently from what is seen in other hereditary anemias, such as thalassemias, siderosis in patients with sickle cell disease (SCD) usually affects the liver but only rarely the myocardium [1,6]. Here we report on a systematic review of the literature upon a fatal case of a patient with sickle cell anemia who presented with cardiac iron overload. Increased awareness of clinical characteristics that predispose to myocardial iron deposition in patients with SCD may help improve the cost-effectiveness of screening this patient population with high-cost MR for a very rare but potentially fatal complication.

Methods

The case reported here was identified during a retrospective chart review of SCD patients who have undergone MR for tissue iron quantification at the Hematology and Hemotherapy Center, Hemocentro Campinas, in Campinas, Brazil (Tavares et al, manuscript in preparation). The study has been approved by the local ethics board (approval number 57832616.1.0000.5404) and was conducted according to the guidelines outlined in Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement.

Eligibility Criteria

Manuscripts considered eligible for this review included those: (1) written in English, (2) containing at least serum ferritin and cardiac T2* values, and (3) including sickle cell disease patients.

Information Sources and Search Strategy

The Medline bibliographic database of the National Library of Medicine, accessed through the National Institute of Health's PubMed online resource, and the Web of Knowledge, accessed through the Web of Science website were searched limiting to publications between January 1, 2004, to January 31, 2019, to be included in this review, spanning the time period after which T2* data started to be used for tissue iron quantification. The primary search strategy used for Pubmed was ("Hemoglobin, Sickle"[Mesh] OR "Anemia, Sickle Cell"[Mesh] OR "Hemoglobin SC Disease"[Mesh]) AND ("iron overload"[MeSH Terms] OR iron overload[Text Word]) AND ("heart" OR "cardiac"), and was adapted for Web of Knowledge as TOPIC: ("sickle hemoglobin" OR "sickle cell dis" OR "sickle cell anemia") AND TOPIC: ("cardiac iron overload" OR "cardiac siderosis" OR "cardiac iron" OR "heart iron").

Study Selection

The abstracts and keywords were examined by two reviewers to ensure that the articles met the eligibility criteria. Each article was then analyzed in full text. Articles not meeting eligibility criteria were then excluded from this review.

Data Collection Process and Data Items

For each eligible study, clinical and laboratory data such as age, gender, serum ferritin and cardiac T2* were extracted. Additional findings that could be relevant to the clinical characterization of each case were also included.

Results

Case Report

A 47-year-old woman diagnosed with sickle cell anemia (SCA) was admitted to the emergency room on May 29, 2017, complaining of fatigue, generalized myalgia and a dry cough for the past 4 days. She had been started on chronic transfusions due to severe anemia

(hemoglobin 4.8 g/dL) in 2004, and had not improved with hydroxyurea alone or in association with erythropoietin, with a cumulative transfusion burden of 294 red blood cell units in her lifetime. A diagnosis of iron overload was made in 2007 with ferritin of 3520 ng/mL, but no magnetic resonance (MR) was available at that time. She was prescribed combination therapy with desferoxamine and deferiprone, but had to stop deferiprone after struggling for 4 months with gastric intolerance. Compliance with desferoxamine was suboptimal, between 3 and 5 days/week. Her ferritin progressively increased to 10 219 ng/mL in 2011, and reached 15 914 ng/mL in 2012, when her first MR showed liver iron concentration (LIC) of 6.9 mg/g and an abnormal cardiac T2* of 8.5 ms (myocardial iron concentration of 3.31 mg/g). She was then retried on combination with deferiprone 75 mg/kg per day. This was again unsuccessful, but she tolerated a reduced dose of deferiprone of 30 mg/kg per day. While her ferritin decreased to the 8000–11 000 ng/mL range, her subsequent MR in 2013 suggested poor adherence to iron chelation, with extreme elevation of LIC to 27.6 mg/g and a further decrease in heart T2* to 7.2 ms (MIC 4.1 mg/g). A year later in 2014, her heart T2* was 5.3 ms (MIC 5.88 mg/g), and she successfully progressed to deferiprone 60 mg/kg per day. This proved to be effective, and her MR in July 2015 showed her heart T2* increased to 7.5 ms, after which she unfortunately stopped deferiprone despite medical recommendation to continue it. Her latest iron studies in May 2017 included a ferritin of 8511 ng/mL with a transferrin saturation of 94%, and her MR showing a cardiac T2* back to 5.84 ms.

On admission, initial assessment supported the diagnosis of decompensated congestive heart failure with worsening anemia. Her labs showed a Hb drop from 6.5 g/dL (her average level in the past year) to 5.7 g/dL, high DHL 740 U/L, blood urea nitrogen 103 U/L, creatinine 1.53 mg/dL, elevated troponin I (331 ng/mL), and D-dimer (4349 ng/mL). HbS level was 72%, and she had been last transfused 75 days before admission. During this hospitalization, she was also newly diagnosed with diabetes, requiring insulin therapy. Given her history of cardiac iron overload, she was also put on intensive iron chelation therapy with continuous intravenous infusion of desferoxamine and oral deferiprone. Unfortunately, she developed a mixed cardiogenic and septic shock after 10 days and died.

Study Selection

We found 160 articles in the Pubmed database of the National Library of Medicine, and 205 articles in the Web of Knowledge database. After duplicates were removed, 135 unique articles were identified using the MeSH keywords previously described. We excluded 115 studies (37 not including SCD patients, 25 missing ferritin or T2* data, 12 technical or experimental reports, 41 reviews). Therefore, 20 reports met the eligibility criteria established. Fig 1 shows the PRISMA flow-chart of the systematic review.

Study Characteristics and Findings

Table 1 summarizes the data collected from 20 reports, in addition to the current report. Most prior reports (11/20) were published by researchers in the United States, followed by four in Greece two in Brazil, and one each in France, Israel, Egypt, and Lebanon. Nine studies [7–15] comprised 336 evaluated patients mostly pediatric patients (under 18 years old) and correlated laboratory measurements of iron and MR results. Another nine studies [1,6,16–22] reported on mostly adult patients, describing MR findings and the remaining studies are case reports or case series [23,24].

Most studies (14/20) were descriptive reports of populations regarding the evaluation of tissue iron as determined by MR. Two of them included pancreatic iron evaluation. Seven studies aimed specifically at determining association with other variables that could predict IO or influence its severity, such as transfusion burden, use of erythrocytapheresis, echocardiographic findings, and laboratory

ARTICLE IN PRESS

4

A.H.J. Tavares et al. / Transfusion Medicine Reviews xxx (xxxx) xxx

Table 1

Summary of the studies included in this review

Author, Year	Study population	Age	Ferritin, ng/mL	Patients with MIO	Heart T2* in patients with MIO, ms	MIC in patients with MIO, mg/g	Iron chelation
Wood et al, 2004	17 SS	17.6 (1.3)	5422 (855)	None	NA	NA	Yes
Tsironi et al, 2005	1 SB	33	4450 (2300-6600)	1	7.3	3.98	Yes, with IV DFO + DFP, and SQ DFO + DFP
Voskaridou et al, 2005	5 SS, 10 SBO	46 (25-67)	754-7620	None	NA	NA	Yes, with DFP
Raman et al, 2006	17 SS, 2 SB, 3 SC	27 (19-47)	53 to >1000	None	NA	NA	Yes
Inati et al, 2009	17 SS, 6 SB	24.4 (4-49)	997.7 (1110.9)	None	NA	NA	No
Ghoti et al, 2010	10 SBO	32.5	3596 (3134)	None	NA	NA	Yes, with DFO or oral chelator
Hankins et al, 2010	28 SS, 2 SBO	13 (8-18)	3089 (2167)	None	NA	NA	Yes
Noetzli et al, 2010	103 SCD	14.7 (4.6)	3943.2 (3463.6)	None	NA	NA	Yes, with DFO or DFX
Voskaridou et al, 2011	31 SB	41 (27-55)	1989 (923)	None	NA	NA	Yes, with DFX
Kaushik et al, 2012	9 SS, 1 SC	NR	2380.2 (1421.3)	None	NA	NA	NR
Berdoukas et al, 2013	43 SCD	<10	Close to 1000	None	NA	NA	Yes
Junqueira et al, 2013	27 SCD	37.5 (14.8)	2787.9 (1857)	None	NA	NA	Yes, with DFO or DFX
Meloni et al, 2014	201 SCD	22.7 (17-29.6)	9714.54 (4604.82-10383.57)	5	7.8-20.0	1.13-3.73	Yes, with DFO (including IV) or DFX
Aubart et al, 2016	30 SS or SBO	10 (3.6-18)	1917 (184-6204)	None	NA	NA	Yes, with DFX
Badawy et al, 2016	32 SS	15 (8-23)	1995 (575-10 683)	None	NA	NA	Yes, with DFO or DFX
Myers et al, 2016	20 SS, 7 SBO, 2 SC	13.5 (4.8)	865.1 (429.5)	None	NA	NA	Yes, with DFX
		13.3 (3.8)	32.5 (356.9)				
de Montalembert et al, 2017	41 SS	22.9 (13.5)	1500 (905-2804)*	None	NA	NA	Yes
			2075 (448-3670)**				
Oduor et al, 2017	66 SCD (2 SS reported)	35 and 44	17 268 and 19 147	2	10.9 and 12	2.17 and 2.44	Yes, DFX or IV DFO
El Alfy et al, 2018	24 SS, 16 SB	12.3 (3.0)	2460.3 (1458.0)	None	NA	NA	Yes, with DFP
Cançado et al, 2018	92 SCD	34.6 (17.0)	1172-2427	2***	7.2-12.4***	2.09-4.05	Variable [§]
Tavares et al, 2019 (current report)	1 SS	47	8511-11 567	1	5.83	5.23	Yes, SQ DFO + DFP, SQ DFO, and IV DFO + DFP
Combined reports	865	4-67	184-19 147	11	5.83-20.0	1.13-5.23	

Data are expressed as median (range) or mean (standard deviation) when more than 2 patients are reported. For the total population of the review, ranges are shown. *Patients in exchange transfusion; **Patients not in exchange transfusion; ***Report does not precise the number of patients with SCD and MIO, but at least two countries reported T2* below 20, which have been used as the range for T2* and MIC in patients with MIO. MIO, myocardial iron overload; MIC, myocardial iron concentration, as reported or as calculated using free online tool <http://isodense.com/ic/>; [§]No report on individual cases, some patients did not receive chelation, others deferasirox, desferoxamine, or deferiprone. NA, not applicable; SCD, sickle cell disease, not otherwise specified; SS, sickle cell anemia; SB, sickle beta thalassemia, mutation type not specified; SBO, sickle beta zero thalassemia; SC, hemoglobin SC disease; WNL, within normal limits; SD, standard deviation; NR, not reported; SQ, subcutaneous; IV, intravenous; DFO, desferoxamine; DFP, deferiprone; DFX, deferasirox.

reported the use of an implantable cardioverter defibrillator to treat arrhythmia.

Discussion

Iron overload is an expected complication of chronic transfusion, and its use is not exclusive to SCD patients, transfusions being also used in clinical practice for other hereditary anemias, such as thalassemias [25], as well as for acquired conditions, such as aplastic anemia and myelodysplastic syndromes. Iron can accumulate not only in the liver, but also in the heart, pancreas, thyroid, and pituitary gland, but the occurrence and severity of iron deposition in each organ varies widely, and it seems to depend on the transfusion burden and the baseline cause of anemia. In this report, we have focused on the occurrence of iron deposition in the heart of patients with SCD. The pathophysiology of SCD differs from other transfusion-dependent anemias because erythropoiesis is effective and accelerated, as a mechanism driven by erythropoietin to compensate for the premature destruction of red blood cells, as opposed to ineffective erythropoiesis in thalassemia and myelodysplastic syndromes, or depletion of marrow erythroid cells (and all other progenitors) in aplastic anemia [4,22]. In addition, SCD is characterized by a chronic inflammation state due to recurrent vaso-occlusion, which favors an overlapping anemia of inflammation that favors iron entrapment in macrophages. Furthermore, transfusion strategies employed for SCD often target a specific level of hemoglobin S rather than a fixed hemoglobin level, which leads to the preferred use of manual or automated exchange transfusion rather than top-up transfusions. This reduces the relative volume of packed red blood cells transfused, providing these patients with a delay in the onset of

iron overload in comparison with patients with other anemias. The combination of increased erythropoiesis, inflammation, and lower transfusion volume results in lower levels of non-transferrin bound iron (NTBI) and its chelatable fraction labile plasma iron (LPI), which is most associated with extrahepatic iron deposition [26].

Our data show that myocardial iron overload (MIO) has been very rarely reported in SCD, and suggest it is indeed a rare event, even though liver iron overload is very prevalent in SCD on chronic transfusion. The amount of liver iron deposit is, usually, the first to increase when patients are faced with excess iron, and LIC is predicted to increase depending on the number of packed red blood cell units transfused [27]. Some of the studies identified in this review support that transfusion burden may predict a higher risk for MIO, particularly if associated with very low target hemoglobin S (below 10%) [14]. This suggests that only a minority of patients would benefit from cardiac MR scans, and indications for aggressive transfusion therapy in SCD should be carefully reviewed considering the possibility of developing MIO.

Another common feature in case reports of MIO in SCD is lack of adherence to iron chelation therapy. In the case described here, and in others, years of poor adherence to treatment resulted in irreversible cardiac damage and death. Therefore, it would be advisable to include cardiac MR for patient with suspected poor adherence to iron chelators. On one hand, persistent ferritin elevation should be used with caution as a non-specific marker for failure to chelate adequately in SCD because chronic inflammation is part of the pathophysiology of SCD. On the other hand, high values of transferrin saturation are associated with the formation of non-transferrin iron binding (NTBI) and this free form of iron is able to generate reactive oxygen species (ROS) that can lead to tissue damage. Despite its low specificity for iron overload,

Please cite this article as: A.H.J. Tavares, B.D. Benites and K.Y. Fertrin, Myocardial Iron Overload in Sickle Cell Disease: A Rare But Potentially Fatal Complication of Transfusion, Transfusion Medicine Reviews, <https://doi.org/10.1016/j.tmr.2019.04.001>

ARTICLE IN PRESS

6

A.H.J. Tavares et al. / Transfusion Medicine Reviews xxx (xxxx) xxx

- [9] Berdoukas V, Nord A, Carson S, Puliyl M, Hofstra T, Wood J, et al. Tissue iron evaluation in chronically transfused children shows significant levels of iron loading at a very young age. *Am J Hematol* 2013;88:283–5. <https://doi.org/10.1002/ajh.23543>.
- [10] Noetzli LJ, Coates TD, Wood JC. Pancreatic iron loading in chronically transfused sickle cell disease is lower than in thalassaemia major. *Br J Haematol* 2011;152:229–33. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2010.08476.x>.
- [11] Badawy SM, Liem RI, Rigby CK, Labotka RJ, DeFreitas RA, Thompson AA. Assessing cardiac and liver iron overload in chronically transfused patients with sickle cell disease. *Br J Haematol* 2016;175:705–13. <https://doi.org/10.1111/bjh.14277>.
- [12] Hankins JS, McCarville MB, Hillenbrand CM, Loeffler RB, Ware RE, Song R, et al. Ventricular diastolic dysfunction in sickle cell anemia is common but not associated with myocardial iron deposition. *Pediatr Blood Cancer* 2010;55:495–500. <https://doi.org/10.1002/pbc.22587>.
- [13] Voskaridou E, Douskou M, Terpos E, Stamoulakou A, Meletis J, Ourailidis A, et al. Deferiprone as an oral iron chelator in sickle cell disease. *Ann Hematol* 2005;84:434–40. <https://doi.org/10.1007/s00277-005-1015-7>.
- [14] Meloni A, Puliyl M, Pepe A, Berdoukas V, Coates TD, Wood JC. Cardiac iron overload in sickle-cell disease. *Am J Hematol* 2014;89:678–83. <https://doi.org/10.1002/ajh.23721>.
- [15] Junqueira FP, Fernandes JL, Cunha GM, Kubo T TA, Lima C MAO, Lima D BP, et al. Right and left ventricular function and myocardial scarring in adult patients with sickle cell disease: a comprehensive magnetic resonance assessment of hepatic and myocardial iron overload. *J Cardiovasc Magn Reson* 2013;15:83. <https://doi.org/10.1186/1532-429X-15-83>.
- [16] Inati A, Musallam KM, Wood JC, Sheikh-Taha M, Daou L, Taher AT. Absence of cardiac siderosis by MRI T2* despite transfusion burden, hepatic and serum iron overload in Lebanese patients with sickle cell disease. *Eur J Haematol* 2009;83:565–71. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01345.x>.
- [17] Voskaridou E, Plata E, Douskou M, Sioni A, Mpoutou E, Christou D, et al. Deferasirox effectively decreases iron burden in patients with double heterozygous HbS/ β -thalassaemia. *Ann Hematol* 2011;90:11–5. <https://doi.org/10.1007/s00277-010-1029-7>.
- [18] Raman SV, Simonetti OP, Cataland SR, Kraut EH. Myocardial ischemia and right ventricular dysfunction in adult patients with sickle cell disease. *Haematologica* 2006;91:1329–35.
- [19] Kaushik N, Eckrich MJ, Parra D, Yang E. Chronically transfused pediatric sickle cell patients are protected from cardiac iron overload. *Pediatr Hematol Oncol* 2012;29:254–60. <https://doi.org/10.3109/08880018.2011.630774>.
- [20] Oduor H, Minniti CP, Brofferio A, Gharib AM, Abd-Elmoniem KZ, Hsieh MM, et al. Severe cardiac iron toxicity in two adults with sickle cell disease. *Transfusion* 2017;57:700–4. <https://doi.org/10.1111/trf.13961>.
- [21] ElAlfy MS, Adly AAM, Ebeid FSE, Eissa DS, Ismail EAR, Mohammed YH, et al. Immunological role of CD4+CD28null T lymphocytes, natural killer cells, and interferon-gamma in pediatric patients with sickle cell disease: relation to disease severity and response to therapy. *Immunol Res* 2018;66:480–90. <https://doi.org/10.1007/s12026-018-9010-y>.
- [22] Cancado R, Watman NP, Lobo C, Chona Z, Manzur F, Traina F, et al. Assessment of liver and cardiac iron overload using MRI in patients with chronic anemias in Latin American countries: results from ASIMILA study. *Hematology* 2018;23:676–82. <https://doi.org/10.1080/10245332.2018.1461292>.
- [23] Tsironi M, Polonifi K, Deftereos S, Farmakis D, Andriopoulos P, Moyssakis I, et al. Transfusional hemosiderosis and combined chelation therapy in sickle thalassaemia. *Eur J Haematol* 2005;75:355–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2005.00528.x>.
- [24] Ghoti H, Goitein O, Koren A, Levin C, Kushnir T, Rachmilewitz E, et al. No evidence for myocardial iron overload and free iron species in multitransfused patients with sickle/ β 0-thalassaemia. *Eur J Haematol* 2010;84:59–63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.2009.01355.x>.
- [25] Allali S, de Montalembert M, Brousse V, Chalumeau M, Karim Z. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfus Clin Biol* 2017;24:223–6. <https://doi.org/10.1016/j.traci.2017.06.008>.
- [26] Porter JB, Garbowski M. The pathophysiology of Transfusional Iron overload. *Hematol Oncol Clin North Am* 2014;28:683–701. <https://doi.org/10.1016/j.hoc.2014.04.003>.
- [27] Kohne E. Hemoglobinopathies. *Dtsch Arzteblatt Online* 2011. <https://doi.org/10.3238/arztebl.2011.0532>.
- [28] Gladwin MT, Barst RJ, Gibbs JSR, Hildesheim M, Sachdev V, Nouraie M, et al. Risk factors for death in 632 patients with sickle cell disease in the United States and United Kingdom. *PLoS One* 2014;9:e99489. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099489>.
- [29] Mehari A, Gladwin MT, Tian X, Machado RF, Kato GJ. Mortality in adults with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *JAMA* 2012;307:1254. <https://doi.org/10.1001/jama.2012.358>.
- [30] Ginwalla M, AlMasoud A, Tofovic D, Alin T, Al-Kindi S, Oliveira G, et al. Cardiovascular evaluation and management of iron overload cardiomyopathy in sickle cell disease. *Am J Hematol* 2018;93:E7–9. <https://doi.org/10.1002/ajh.24924>.
- [31] Le Lan C, Loréal O, Cohen T, Ropert M, Glickstein H, Lainé F, et al. Redox active plasma iron in C282Y/C282Y hemochromatosis. *Blood* 2005;105:4527–31. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-09-3468>.
- [32] Jensen PD, Jensen FT, Christensen T, Nielsen JL, Ellegaard J. Relationship between hepatocellular injury and transfusional iron overload prior to and during iron chelation with desferrioxamine: a study in adult patients with acquired anemias. *Blood* 2003;101:91–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1704>.
- [33] Pootrakul P, Breuer W, Sametband M, Sirankapachra P, Hershko C, Cabantchik ZI. Labile plasma iron (LPI) as an indicator of chelatable plasma redox activity in iron-overloaded beta-thalassemia/HbE patients treated with an oral chelator. *Blood* 2004;104:1504–10. <https://doi.org/10.1182/blood-2004-02-0630>.
- [34] Voskaridou E, Kattamis A, Fragodimitri C, Kourakli A, Chalkia P, Diamantidis M, et al. National registry of hemoglobinopathies in Greece: updated demographics, current trends in affected births, and causes of mortality. *Ann Hematol* 2019;98:55–66. <https://doi.org/10.1007/s00277-018-3493-4>.
- [35] Wood JC. The use of MRI to monitor iron overload in SCD. *Blood Cells Mol Dis* 2017;67:120–5. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2017.09.002>.
- [36] Noetzli LJ, Papudesi J, Coates TD, Wood JC. Pancreatic iron loading predicts cardiac iron loading in thalassaemia major. *Blood* 2009;114:4021–6. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-06-225615>.
- [37] Meloni A, De Marchi D, Pistoia L, Grassedonio E, Peritore G, Preziosi P, et al. Multi-center validation of the magnetic resonance T2* technique for quantification of pancreatic iron. *Eur Radiol* 2019;29:2246–52. <https://doi.org/10.1007/s00330-018-5783-6>.

4.2 Manuscrito em preparo para submissão

Sobrecarga de ferro em pacientes com hemoglobinopatias em regiões com acesso limitado a ressonância magnética

Tavares, Alvaro Henrique Junqueira*
Vendrame, Felipe*
Benites, Bruno Deltreggia*
Saad, Sara Therezinha Olalla*
Otávio Rizzi, Coelho-Filho**
Costa, Fernando Ferreira*
Fertrin, Kleber Yotsumoto*,***

*Centro de Hematologia e Hemoterapia – Hemocentro Campinas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

**Disciplina de Cardiologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil.

***Division of Hematology, University of Washington, Seattle, WA, EUA.

RESUMO

Introdução: Pacientes com hemoglobinopatias podem necessitar de transfusões, o que pode levar à sobrecarga de ferro. O exame de ressonância magnética (RM) pela sequência de T2* é um método não invasivo, sensível e específico para medir a concentração de ferro hepática (LIC) e a concentração de ferro miocárdica (MIC), mas não é tão disponível em países em desenvolvimento onde a doença falciforme (DF) e a talassemia (TAL) são mais prevalentes, quanto os exames de bioquímica tradicionais. **Objetivos:** O objetivo desse estudo foi avaliar e comparar sobrecarga de ferro em pacientes com DF e TAL em seguimento no Hemocentro Campinas avaliados tanto com exames tradicionais de bioquímica (ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação ao ferro – TIBC e índice de saturação de transferrina – IST) e hemograma completo, quanto com LIC e MIC medidos por RM, e estudar as correlações entre essas medidas. **Métodos:** Estudo retrospectivo que avaliou pacientes com suspeita clínica de sobrecarga de ferro tecidual submetidos ao exame de RM e a exames laboratoriais de abril de 2014 a dezembro de 2018. Os dados foram obtidos do serviço de RM do Hospital de Clínicas da UNICAMP, do sistema do Hemocentro Campinas e do sistema do Laboratório de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP. Foram utilizados os softwares Microsoft Excel

2010 para a construção do banco de dados e GraphPad Prism versão 5.0 para o processamento e análise dos dados. **Resultados:** 34 pacientes (23 com DF e 11 com TAL), mediana de idade 35.5 anos (15-63), sendo 24 mulheres (71%), foram avaliados em 56 diferentes exames de RM (em média, realizados a cada 2 anos). O grupo TAL teve um valor de hemoglobina e saturação da transferrina significativamente maiores (média TAL $10,4 \pm 0,9$ g/dL e mediana 0.82 [0.52-0.96]; média DF $8,56 \pm 1,1$ g/dL e mediana 0.62 [0.29-0.97] $P=0.006$ e $P=0.0021$). Sobrecarga de ferro hepática foi encontrada em 23 (92%) pacientes com DF e em 10 pacientes (90%) com TAL. Apenas um paciente DF e dois com TAL apresentaram sobrecarga de ferro miocárdica. A ferritina sérica se correlacionou com LIC ($r=0.59$, $P<0.0001$) e com o $T2^*$ cardíaco ($r=-0.44$, $P<0.0001$). As análises por curvas ROC (*Receiver operating characteristic*) mostraram que os valores de ferritina são excelentes preditores de LIC acima de 2mg/g e predizem bem valores de $T2^*$ cardíaco abaixo de 20ms (área sob a curva 0.9767, $P=0.0002$, e 0.7663, $P=0.017$, respectivamente). O valor de corte da ferritina de 562ng/mL teve uma sensibilidade de 93,5% e uma especificidade de 88,9% para discriminar a presença de qualquer grau de sobrecarga de ferro hepática. Para sobrecarga de ferro cardíaca, o valor de corte do índice de saturação de transferrina de 95,4% foi necessário para discriminar a presença de qualquer grau de sobrecarga cardíaca com uma sensibilidade de 42,9% e uma especificidade de 96,5%. A análise de um subgrupo de pacientes com mais de um exame de RM nos permitiu avaliar se variações entre medidas pareadas dos exames laboratoriais e de imagem se correlacionavam. A variação da ferritina se correlacionou melhor com mudanças no LIC em pacientes com DF, enquanto a variação do TIBC se correlacionou com mudanças no $T2^*$ em pacientes com TAL. Isso sugere que observar a tendência da ferritina ou do TIBC pode ser útil em decidir antecipar ou postergar exames de RM durante o tratamento desses pacientes. **Conclusão:** Nossos dados concordam com a literatura publicada, mostrando diferenças no padrão de sobrecarga de ferro entre pacientes com DF e TAL, e sugere que, em locais em que há acesso limitado a RM, exames laboratoriais podem ser úteis para otimizar a indicação de RM para diagnóstico e monitoramento de sobrecarga de ferro transfusional em pacientes com hemoglobinopatias.

Palavras-chave: Ferritina, anemia falciforme, talassemia, quelação de ferro.

ABSTRACT

Patients with hemoglobinopathies may need transfusions, which may lead to iron overload (IO). Magnetic resonance imaging (MRI) using T2* is a noninvasive, sensitive and specific method for measuring liver iron concentration (LIC) and myocardial iron concentration (MIC) but is not as available as more traditional biochemical tests in developing countries where sickle cell disease (SCD) and thalassemia (THAL) are more prevalent. The aim of this study was to evaluate and compare IO in patients with SCD and THAL under follow-up at Hemocentro Campinas - UNICAMP, as evaluated with traditional biochemical tests (serum ferritin, serum iron, total iron binding capacity - TIBC, and transferrin saturation index - TSI) and LIC, cardiac T2*, and MIC as measured by magnetic resonance imaging, and to study the correlations between the obtained measurements. From April 2014 to December 2018, data from 34 patients (23 with SCD; 11 with THAL), mean age 35.5 years (15-63), 24 women (71%), were collected from 56 MRI scans (mostly every 2 years). The THAL group had significantly higher hemoglobin and TSI levels. Liver IO defined by LIC > 2mg/g was detected in 23/25 (92%) patients in the SCD group, and 10/11 (90%) in the THAL group. Only one patient from the SCD group and two from the THAL group had cardiac iron overload. Serum ferritin correlated with LIC ($r = 0.59$ $P < 0.0001$) and cardiac T2* ($r = -0.44$, $P < 0.0001$). Analyses using the receiver operator characteristic curves (ROC) showed that a ferritin cut-off value of 562ng/mL had a sensitivity of 93,5% and a specificity of 88,9% of predicting a LIC above 2mg/g, and a TSI value of 95,4% had 42,9% sensitivity and 96,5% specificity to detect T2* below 20ms. Subgroup analysis of patients with more than one MRI scan allowed us to evaluate whether variations between paired measurements of laboratory and imaging tests were correlated. Ferritin variation correlated better with differences in LIC in patients with SCD, while TIBC variation correlated with T2* in the THAL population. This suggests that observing the trend of ferritin or TIBC may be helpful to decide to anticipate or postpone MRI scans during the treatment of those patients. Our data agree with published literature showing differences in the pattern of iron overload between patients with SCD and THAL, and suggest

that, in places with limited access to MRI, laboratory tests may be useful to optimize MRI indication to diagnose and monitor transfusion iron overload MRI.

Keywords: Ferritin, sickle cell anemia, thalassemia, iron chelation.

INTRODUÇÃO

O ferro possui papel de grande importância na sobrevivência e multiplicação celular por atuar na regulação da atividade enzimática e nas reações de oxidação-redução (1). Sendo assim, alterações em sua concentração podem causar danos ao metabolismo, como acontece na sua absorção excessiva, resultando, entre outros eventos, na geração citotóxica de hidroxila e radicais livres que ativam o sistema retículo-endotelial, agravando assim o processo inflamatório (2). Não há mecanismo fisiológico para excretar o excesso de ferro do corpo humano, e a absorção do ferro é regulada para evitar seu acúmulo (3). Porém, algumas condições às quais um paciente pode ser submetido podem prejudicar este equilíbrio, resultando em sobrecarga de ferro, como no caso de pacientes com anemias causadas por hemoglobinopatias (4). Dentre elas, destacam-se a doença falciforme e a talassemia.

As doenças falciformes são hemoglobinopatias em que há mutação de ponto do gene da globina beta (*HBB*), levando a produção de uma hemoglobina anormal com uma substituição de um radical de ácido glutâmico (codificado pelo códon GAC) por um de valina (codificado por GTC) (5). Essa alteração leva à produção de hemoglobina S (HbS) que, em baixa tensão de oxigênio, polimeriza no interior das hemácias, gerando feixes de hemoglobina que deformam o eritrócito, originando assim hemácias em forma de foice (5,6). Essa célula tem uma sobrevivência mais curta, sendo destruída por fagócitos, gerando anemia hemolítica crônica. Além disso, as hemácias das doenças falciformes tendem a aderir ao endotélio, causando episódios de crises vaso-oclusivas, quadro característico das doenças falciformes.

As talassemias são um grupo heterogêneo de desordens genéticas de herança autossômica recessiva, que resulta em desequilíbrio da produção de cadeias tipo alfa e beta da hemoglobina, que são normalmente produzidas em uma proporção 1:1. Na talassemia beta, a redução ocorre na produção de cadeias beta, levando a precipitação de cadeias alfa nos precursores eritróides da medula óssea, causando apoptose de eritroblastos e anemia de gravidade variável. As mutações gênicas responsáveis pela talassemia beta no Brasil são majoritariamente originárias da região do Mediterrâneo, enquanto as mutações

associadas a talassemia alfa tendem a ser mais frequentes na África e extremo Oriente (2).

Um dos tratamentos preconizados para hemoglobinopatias é a transfusão de concentrado de hemácias (7). Esse tratamento visa corrigir a diminuição da hemoglobina presente nas talassemias e reduzir a concentração de HbS nas doenças falciformes. A quantidade de ferro que um paciente submetido a transfusões recebe é diretamente proporcional ao volume do hematócrito (Ht) médio da bolsa de transfundida (8,9). Considerando uma quantidade de ferro corporal total de 4000mg em um adulto, admite-se que a transfusão de 20 ou mais concentrados pode dobrar a quantidade de ferro corporal, sendo suficiente para causar sobrecarga de ferro clinicamente significativa.

A avaliação da sobrecarga de ferro é realizada através da dosagem sérica de alguns marcadores, como o ferro sérico, a ferritina, o índice de saturação da transferrina e a capacidade total de ligação ao ferro. O ferro sérico dosado em laboratório reflete os íons Fe^{3+} ligados à transferrina, sendo elevado nos casos de sobrecarga de ferro. A ferritina é utilizada para avaliar o estoque de ferro corporal. A capacidade total de ligação ao ferro, do inglês *Total Iron Binding Capacity* (TIBC), reflete a quantidade de ferro que a transferrina ainda teria capacidade de ligar. O IST é obtido através do quociente entre ferro sérico e TIBC, representando a porcentagem de sítios de ligação do ferro que estão ocupados e é utilizado na avaliação para sobrecarga de ferro (10).

Também podemos avaliar o ferro tecidual através da ressonância magnética (RM). O ferro reduz a intensidade e tempo do sinal paramagnético, que pode ser convertido em miligramas de ferro por grama de peso seco do tecido estudado. Isso acontece pela grande susceptibilidade paramagnética da ferritina e dos cristais de hemossiderina, que contém Fe^{3+} , que diminuem o tempo de relaxamento dos prótons adjacentes nos modos T1 e T2. Esse efeito paramagnético é melhor avaliado em T2 ou T2* (3,11). A RM é uma alternativa ao método de biópsia que foi utilizado durante muitos anos para determinar a concentração de ferro tecidual.

OBJETIVOS

Nossos objetivos foram caracterizar sobrecarga de ferro em uma população de pacientes com doença falciforme e talassemia utilizando exames laboratoriais e ressonância magnética para determinar correlações entre os valores de dosagens bioquímicas e índices de RM, comparar seus resultados entre pacientes conforme tipo de hemoglobinopatia, e correlacionar a variação de valores das dosagens bioquímica e dos índices de RM em pacientes com mais de um exame no período do estudo.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi realizado no Centro de Hematologia e Hemoterapia da Universidade de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brasil. O protocolo de pesquisa e ausência da necessidade de assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, sob o parecer 1656762.

Foram coletados os dados clínicos (idade, sexo, diagnóstico hematológico, terapia transfusional e terapia quelante), laboratoriais (índices hematimétricos, ferritina sérica, ferro sérico, IST) e de imagem (quantificação de conteúdo hepático de ferro e T2* cardíaco) dos sujeitos da pesquisa selecionados dentre os pacientes em acompanhamento no Ambulatório de Hematologia, a partir de consulta aos prontuários médicos impressos e/ou eletrônico e base de dados de exames laboratoriais da Divisão de Patologia Clínica do HC-UNICAMP.

O banco de dados utilizado para a pesquisa foi construído no programa Excel, 2010 (Microsoft, EUA). As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism, 5.0 (GraphPad, EUA). Foi utilizado grau de significância estatística de $P=0,05$. Foram realizadas correlações de Spearman com teste de regressão linear, comparação de grupos através do Teste T de Student, e curvas *receiver operation characteristic (ROC)* para avaliação da predição da sobrecarga de ferro demonstrada por RM pelos exames laboratoriais.

RESULTADOS

Trinta e seis pacientes foram incluídos neste estudo, sendo 25 pacientes com doença falciforme (DF) e 11 pacientes com talassemia (TAL). No grupo DF, 20 pacientes possuíam o diagnóstico de anemia falciforme e 5 pacientes apresentavam S-beta talassemia, enquanto no grupo TAL, 6 pacientes apresentavam talassemia beta maior, 4 apresentavam talassemia beta intermediária e 1 talassemia alfa (doença da hemoglobina H). Os dados demográficos e clínicos dos pacientes incluídos no momento da primeira avaliação por RM estão descritos na Tabela 1.

Não foram observadas diferenças significativas em relação a gênero e idade ($p=0.47$ e $p=0.69$, respectivamente), quando comparados os dois grupos estudados.

Os pacientes com DF apresentaram uma menor contagem de leucócitos (WBC, $p=0.028$), hemácias (RBC, $p<0.0001$), hemoglobina ($p=0.001$) e hematócrito (HCT, $p<0.0001$) e maiores valores de volume corpuscular médio (VCM, $p=0.0007$) do que os pacientes com TAL.

Com relação ao perfil sérico de ferro, as concentrações de ferro sérico foram maiores no grupo de talassemia que no grupo de pacientes com doença falciforme ($p=0.0004$), enquanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os valores de ferritina dos grupos ($p=0.76$). Os valores de saturação da transferrina foram em média maiores que os valores de normalidade (20-45%), apresentando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos, sendo maior no grupo talassemia ($p=0.039$). Os valores de TIBC estavam dentro dos valores de normalidade e não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre grupos ($p=0.26$).

Em relação ao número de exames de RM, 25 pacientes do grupo DF realizaram 42 RM, resultando em uma média de 1,7 RM por paciente, e 11 pacientes do grupo TAL realizaram 29 exames de RM, resultando em uma média de 2.6 RM por paciente no período de 19/08/2004 a 17/07/2018. O paciente com maior número de RM foi submetido ao exame 6 vezes em um período de 9 anos e 11 meses. Os dados completos de bioquímica, dos parâmetros hematológicos e dos dados obtidos na ocasião de todas as RM's estão resumidos na Tabela 2.

Os exames de RM avaliaram a função cardíaca através da medida de fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), e determinaram as concentrações de ferro hepática (LIC, do inglês *liver iron concentration*) e miocárdica (MIC, do inglês *myocardial iron concentration*). Em relação aos valores de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), 8 (33%) pacientes com doença falciforme e 4 (36%) pacientes com talassemia apresentaram valores inferiores a 58% compatíveis com disfunção ventricular, embora sem diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos ($p=0.50$). Os valores de T2* hepático estavam diminuídos quando comparados aos valores de normalidade em ambos os grupos, sem diferença significativa entre grupos quando comparados ($p=0.54$). Analogamente, quando transformados para valores de LIC, esses estavam aumentados quando comparados aos valores de normalidade, mas também não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparamos os grupos ($p=0.73$). Ainda que um paciente com doença falciforme e dois pacientes com talassemia tenham apresentado valores de T2* cardíaco e MIC alterados em relação aos valores de normalidade, não houve diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos ($p=0.4194$ e 0.4494 , respectivamente).

Quanto à gravidade da sobrecarga de ferro hepática e miocárdica encontrada, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. No grupo DF, encontramos a seguinte distribuição de sobrecarga de ferro hepática: 2 pacientes sem sobrecarga, 10 com sobrecarga leve, 12 com sobrecarga moderada e 1 com sobrecarga grave. No grupo TAL, a sobrecarga de ferro hepática encontrada foi: 1 paciente sem sobrecarga, 6 com sobrecarga leve, 2 com sobrecarga moderada e 2 com sobrecarga grave. A sobrecarga de ferro miocárdica nos grupos foi rara, sendo que apenas 1 paciente do grupo DF e 2 pacientes do grupo TAL apresentaram sobrecarga de ferro miocárdica definida por T2* cardíaco menor que 20ms. Contudo, todos esses casos apresentaram sobrecarga grave.

Tabela 1 – Dados clínicos e demográficos da população do estudo no momento da primeira avaliação por ressonância magnética..

	DF (n=25)	TAL (n=11)	Valores de Normalidade	P
Feminino, n (%)	17 (68)	7 (64)	-	0.4748
Idade, (min- máx)	36 (12 - 58)	33 (13 - 63)	-	0.6863
Leucócitos, por mm³	8 (4 - 23)	14 (5 - 16)*	4-10	0.0280
Hemácias, por mm³	3 (2 - 4)	4 (3 - 5)*	M-4.5 - 6.1 F-4.2 - 5.4	0.0001
Hemoglobina, g/dL	9 (7 - 11)	10 (8 - 13)*	M-14-18 F-12-16	0.0010
Hematócrito, %	26 (20 - 33)	33,5 (28 - 39)*	M-41-52 F-36-46	0.0001
VCM, fL	96 (64 - 126)	80 (71 - 89)	80-99	0.0007
Plaquetas, por mm³	372 (160 - 549)		150-400	0.0871
Ferritina, ng/mL	1457 (157 -15783)	1896 (357 - 8353)	M-30-400 F-13-150	0.7573
Ferro sérico, mg/dL	141 (58 - 264)	253 (72 - 322)*	M-70-180 F-60-180	0.0001
IST, %	60 (24 - 92)	81 (30 - 100)*	15-45	0.0393
TIBC, mg/dL	244 (28 - 377)	254 (197 - 499)	255-450	0.2643
FEVE, %	61 (32 - 75)	59 (42 - 74)	58-70	0.5016
T2* hepático, ms	3.7 (1.4 - 22.0)	4.0 (2.3 - 21.0)	>11.4	0.5364
LIC, mg/g	6.9 (0.73 - 14.10)	6.0 (0.8 - 12.0)	<2.0	0.7298
T2* cardíaco, ms	33.3 (8.5 - 47.0)	33.0 (2.95 - 41.0)	>20.0	0.4194
MIC, mg/g	0.63 (0.41 - 3.31)	0.63 (0.48 - 10.07)	<1.16	0.4494

Dados demonstrados por mediana, mínimo e máximo. Valores de P se referem a comparação dos grupos DF vs TAL através do test T (Mann-Whitney), com significância de $p \leq 0.05$ (*). DF, doença falciforme; TAL, talassemia; VCM, volume corpuscular médio; IST, saturação da transferrina; TIBC, capacidade total de ligação ao ferro; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; LIC, concentração de ferro hepática; MIC, concentração de ferro miocárdica.

Tabela 2. Dados laboratoriais e de ressonância magnética da população do estudo considerando todas as ocasiões de avaliação por ressonância magnética.

	DF (n=42)	TAL (n=29)	Valores de Normalidade	P
Hemoglobina, g/dL	8,7 (5,1 - 11,4)	10,1 (7,9 - 13,0)*	F 11,8 - 14,8 M 13,3 - 16,7	<0,001
Hematócrito, %	20,5 (15,4 - 35,2)	31,0 (26,2 - 38,7)*	F 36,0 - 44,0 M 39,0 - 50,0	<0,001
Ferritina, ng/mL	1590 (115 - 15783)	2224 (357 - 8789)	F 13 - 150 M 30 - 400	0,2715
Ferro, mg/dL	100 (58 - 297)	268 (72 - 346)*	F 60 - 180 M 70 - 180	<0,001
IST, %	66,5 (20,0 - 100,0)	85,1 (30,0 - 100,0)*	20,0 - 45,0	0,0051
TIBC, mg/dL)	257 (28 - 377)	299 (197 - 574)*	255 - 450	0,0140
FEVE, %	60 (32 - 75)	59 (42 - 74)	>58	NS
T2* Hepático, ms	4,35 (0,70 - 22,00)	4,30 (1,78 - 34,50)	>15,5	NS
LIC, mg/g	6,32 (0,73 - 39,57)	5,90 (0,30 - 15,26)	<2	NS
T2* Cardíaco, ms	32,6 (5,3 - 47,0)	31,0 (2,9 - 50,0)	>20	NS
MIC, mg/g	0,64 (0,41 - 6,32)	0,68 (0,38 - 10,07)	<1,16	NS
T2* Hepático, ms	4,35 (0,70 - 22,00)	4,30 (1,78 - 34,50)	>15,5	NS
LIC, mg/g	6,32 (0,73 - 39,57)	5,90 (0,30 - 15,26)	<2	NS
T2* Cardíaco, ms	32,6 (5,3 - 47,0)	31,0 (2,9 - 50,0)	>20	NS
MIC, mg/g	0,64 (0,41 - 6,32)	0,68 (0,38 - 10,07)	<1,16	NS

Dados demonstrados por mediana, mínimo e máximo. Valores de P se referem a comparação dos grupos DF vs TAL através do test T (Mann-Whitney), com significância de $p \leq 0.05$ (*). DF, doença falciforme; TAL, talassemia; IST, saturação da transferrina; TIBC, capacidade total de ligação ao ferro; FEVE, fração de ejeção do ventrículo esquerdo; LIC, concentração de ferro hepática; MIC, concentração de ferro miocárdica.

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ferritina dos grupos. Contudo, o valor máximo encontrado no grupo falciforme foi quase o dobro do encontrado no grupo de pacientes com talassemia. Os outros analitos que compõe os exames de bioquímica (ferro sérico, TIBC, e o IST calculado) apresentaram valores de mediana significativamente maiores no grupo talassêmico do que no grupo falciforme. As

medanas da hemoglobina e do hematócrito dos pacientes com doença falciforme foram significativamente menores do que a dos pacientes com talassemia. Nos resultados das RM, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos em relação a fração de ejeção do ventrículo esquerdo, T2* hepático, LIC, T2* cardíaco e MIC.

Avaliamos também os históricos de transfusões através dos volumes dos concentrados de hemácias transfundidos em cada paciente durante o acompanhamento no Hemocentro Campinas, uso de terapia quelante e de sangria terapêutica durante o tratamento dos pacientes com doença falciforme e com talassemia.

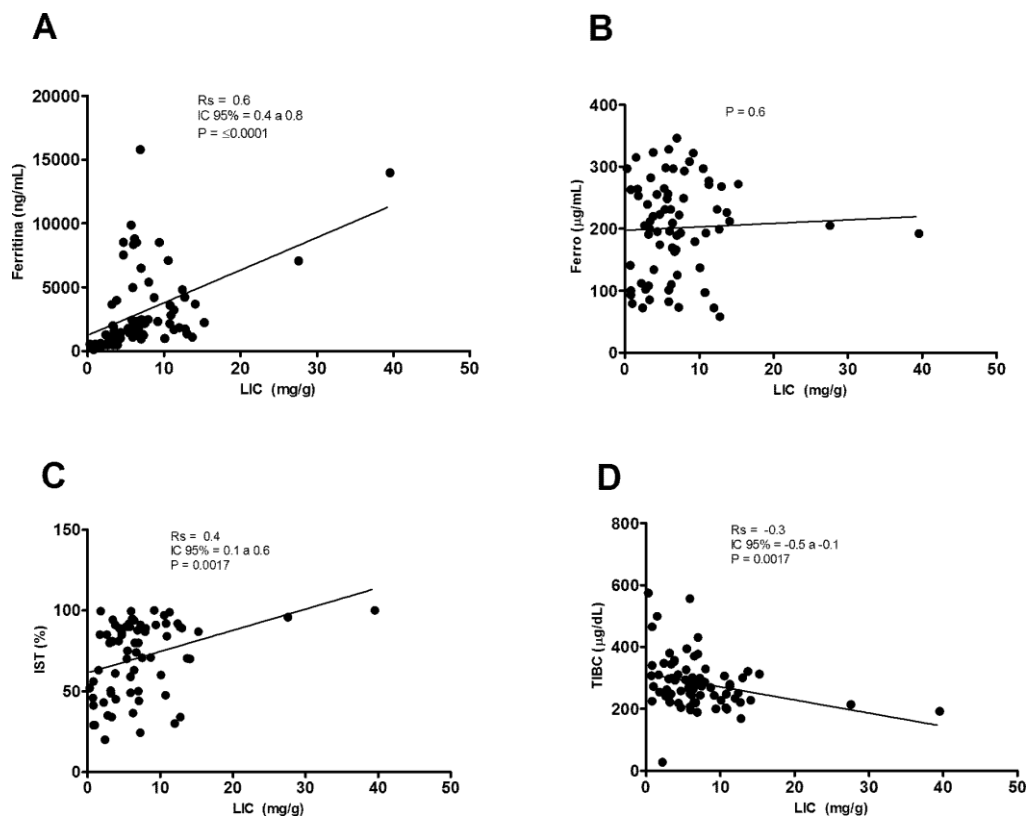
O histórico transfusional dos 25 pacientes com doença falciforme variou entre pacientes que não transfundiram e pacientes com 173mL/kg/ano de sangue transfundido. Em relação ao uso de quelantes, notou-se que, no período do estudo, 10 pacientes não fizeram uso de terapia quelante, enquanto 10 utilizaram deferassirox, 1 utilizou deferassirox e deferiprone e 4 pacientes utilizaram deferassirox, deferiprone e/ou deferroxamina. Destes 15 pacientes que fizeram uso de terapia quelante durante o tratamento, 8 utilizavam terapia quelante no momento do exame de RM. Por fim, 9 pacientes do grupo doença falciforme realizaram sangria terapêutica em conjunto com transfusões durante o período de tratamento.

Dos 11 pacientes com talassemia, o histórico transfusional variou de 0,025mL/kg/ano a 288mL/kg/ano. Um paciente não utilizou quelante durante o tratamento, enquanto 1 utilizou deferroxamina, 1 utilizou deferassirox, 1 utilizou deferassirox e deferiprone, 1 utilizou deferassirox e deferroxamina e 6 utilizaram deferassirox, deferiprone e/ou deferroxamina. Desses 10 pacientes que utilizaram terapia quelante, 7 utilizavam terapia quelante durante o exame de RM.

Para avaliar se os exames bioquímicos podem ser de utilidade em prever a sobrecarga de ferro tecidual determinada por RM, foram estudadas as correlações de ferritina, ferro sérico, IST e TIBC com os valores de LIC (figura 1) e T2* cardíaco (figura 2). Considerando o número de RM's realizadas, independentemente dos grupos estudados, encontramos uma correlação positiva de LIC com os valores de ferritina, $r_s=0.6$, 95% IC 0.4 a 0.7, $p<0.0001$.

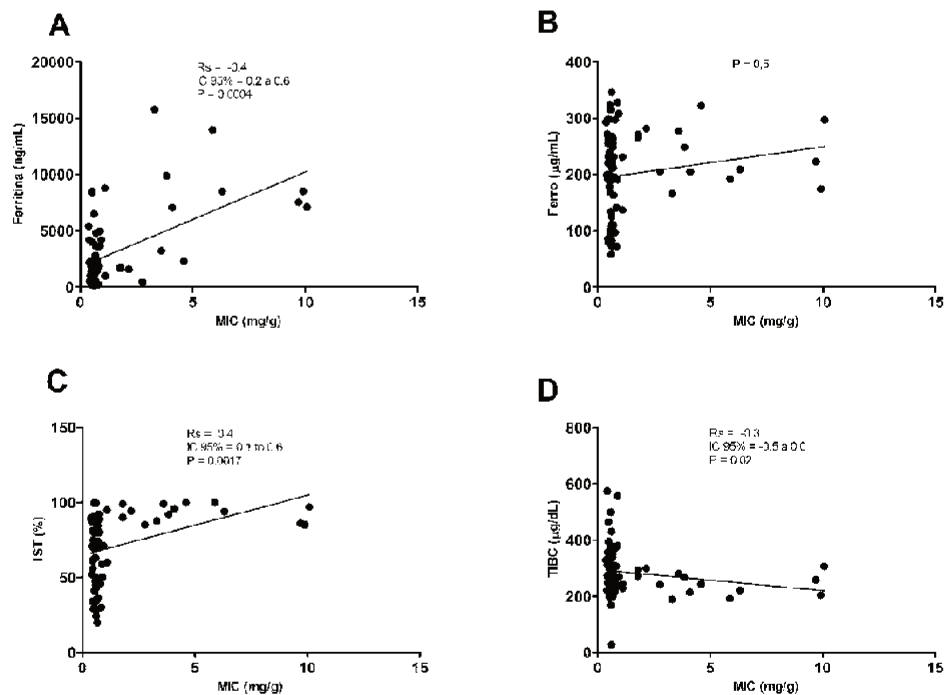
Contudo, não foi observado correlação com os valores de ferro sérico ($p=0.6$). O LIC também se correlacionou positivamente com o índice de saturação da transferrina $r_s=0.4$, 95% IC 0.1 a 0.6, $p<0.002$ e negativamente com o TIBC $r_s=-0.3$ 95% IC -0.5 a -0.1, $p<0.006$. Valores de T2* cardíaco se correlacionaram negativamente com os valores de ferritina $r_s=0.4$ 95% IC -0.6 a -0.2. No entanto, não houve correlação com ferro sérico $p=0.5$. O T2* cardíaco também se correlacionou negativamente com o índice de saturação da transferrina, $r_s=-0.4$ 95% IC -0.6 a -0.1, $p<0.002$ e positivamente com o TIBC $r_s=0.3$ 95% CI 0.03 a 0.5, $p<0.02$.

Figura 1. Correlações e retas de regressão linear entre LIC e exames bioquímicos.



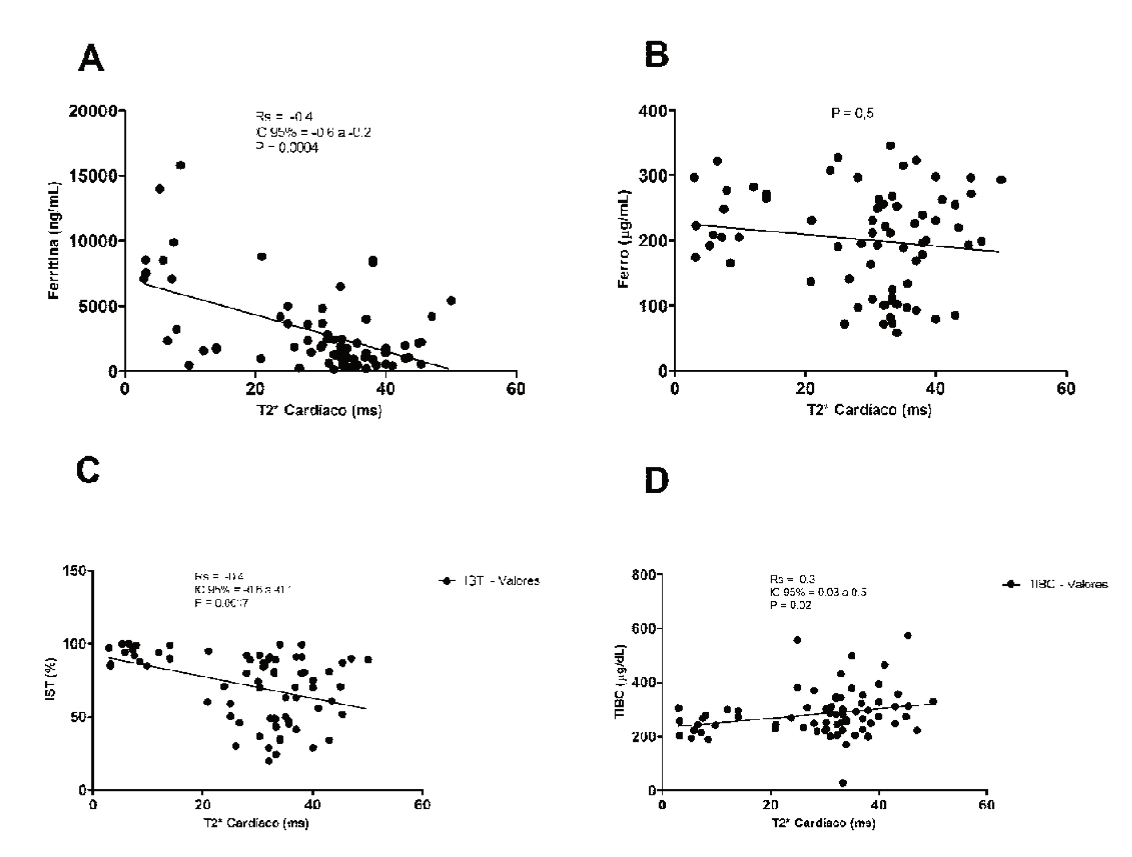
A, correlação entre ferritina e LIC; B, correlação entre ferro e LIC; C, correlação entre IST e LIC; D correlação entre TIBC e LIC.

Figura 2. Correlações e retas de regressão linear entre conteúdo miocárdico de ferro (MIC) e exames bioquímicos.



A, correlação entre ferritina e MIC; B, correlação entre ferro e MIC; C, correlação entre índice de saturação da transferrina (IST) e MIC; D correlação entre TIBC e MIC.

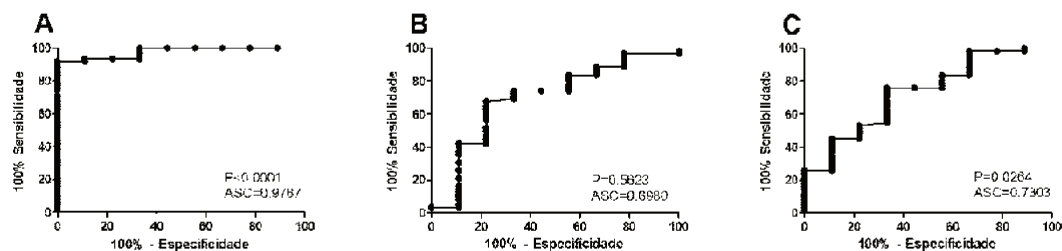
Figura 3. Correlações e retas de regressão linear entre T2* cardíaco e exames bioquímicos.



A, correlação ferritina e T2* cardíaco; B, correlação ferro e T2* cardíaco; C, correlação IST e T2* cardíaco; D correlação TIBC e T2* cardíaco.

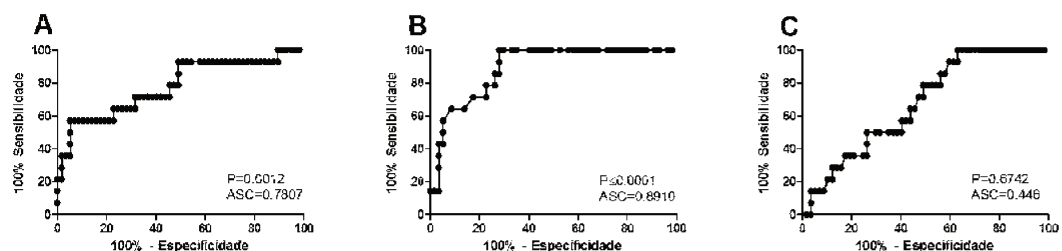
Conforme demonstrado nas figuras 1, 2 e 3, apenas o ferro sérico não apresentou correlação significativa com LIC, MIC e T2* cardíaco. Assim, utilizando as curvas ROC, avaliamos a sensibilidade e a especificidade de cada analito em prever qualquer grau de sobrecarga de ferro tecidual demonstrada pela RM. Para essa análise, as dosagens de bioquímica dos pacientes com valores normais de LIC (<2mg/g) foram utilizadas como “controle”, e os valores de bioquímica dos pacientes com valores anormais de LIC (>2mg/g) foram utilizadas como “caso”, conforme demonstrado na figura 4. O mesmo procedimento foi adotado para avaliar cada analito em relação ao T2* cardíaco (figura 5), definindo como “controle” os pacientes com T2*>20ms, e como “caso, T2*<20ms.

Figura 4. Curvas ROC dos exames de bioquímica para sobrecarga hepática de ferro definida por LIC acima de 2mg/g.



ROC, receiver operating characteristic; A, ferritina; B, IST; C, TIBC; ASC, área sob a curva.

Figura 5. Curvas ROC dos exames de bioquímica para sobrecarga miocárdica de ferro definida por T2* cardíaco abaixo de 20ms.



ROC, receiver operating characteristic; A, ferritina; B, IST; C, TIBC; ASC, área sob a curva.

Na Figura 4, a maior área sob a curva (ASC) foi a da ferritina, de 0,9767. Assim, em seu melhor ponto de discriminação, uma dosagem de ferritina de 562ng/mL foi capaz de prever qualquer grau de sobrecarga de ferro hepática com sensibilidade de 93,5% e especificidade de 88,9%.

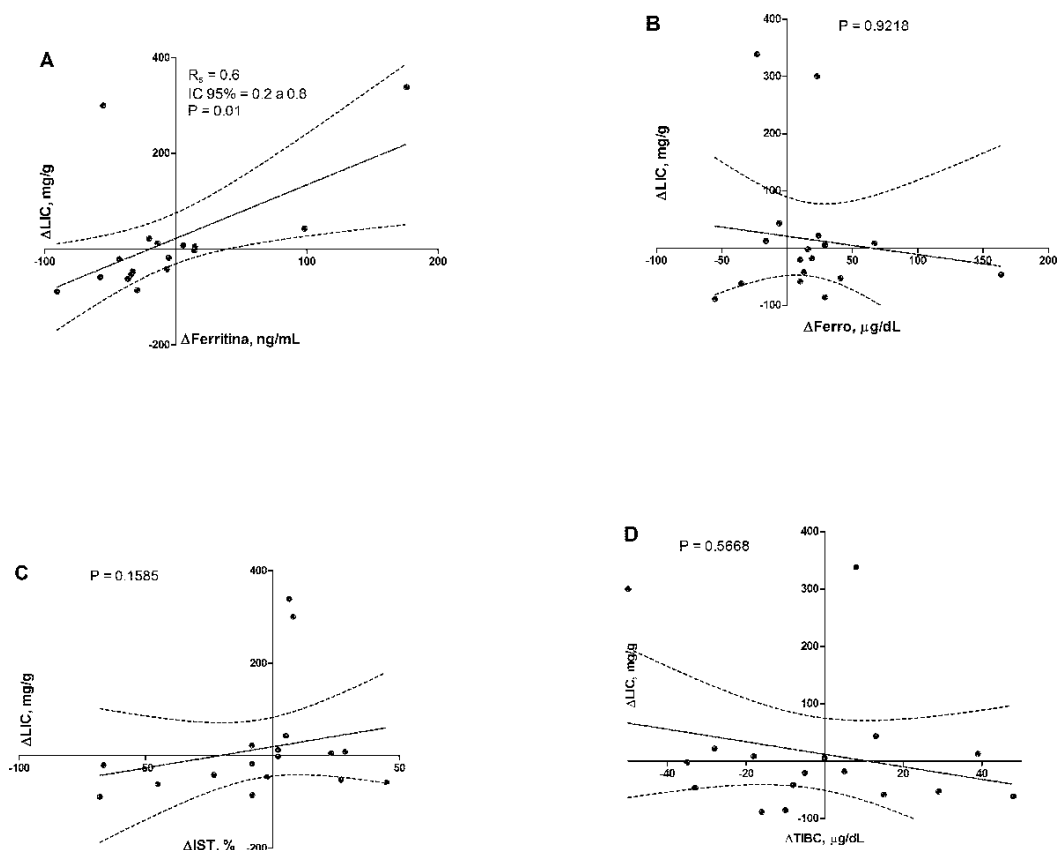
Na Figura 5, a maior área sob a curva obtida corresponde ao IST, no valor de 0,8910. O melhor ponto da curva de IST foi equivalente à dosagem de 95,4%, que consegue prever qualquer grau de sobrecarga de ferro cardíaca com sensibilidade de 42,9% e sensibilidade de 96,5%.

Para avaliar as correlações entre as variações dos analitos em paciente que realizaram exames em mais de uma ocasião, analisamos os diferentes pares de exames e utilizamos a variação em porcentagem em relação ao exame mais antigo. Avaliamos separadamente os grupos com doença

falciforme e com talassemia, correlacionando variações em ferritina, ferro, IST e TIBC com as das variáveis LIC, MIC e T2* cardíaco (Figuras 6 a 11).

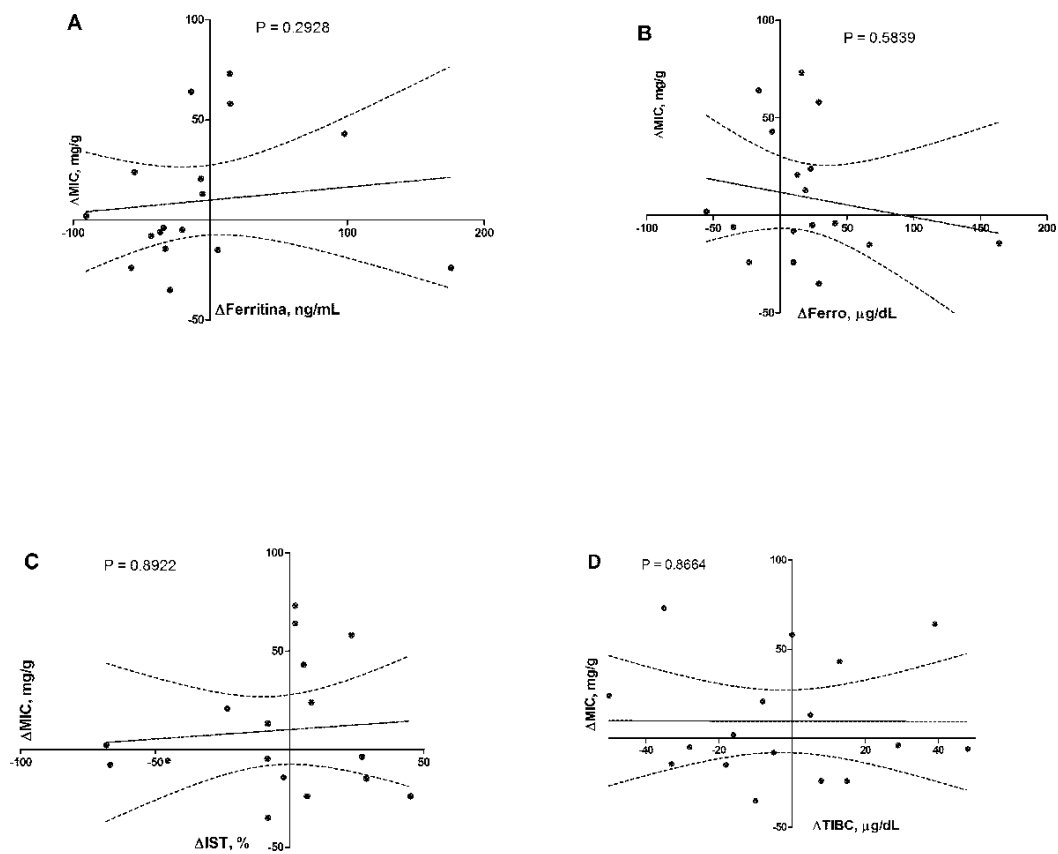
Nos pacientes com doença falciforme, encontramos correlação apenas entre a variação de LIC e a de ferritina, conforme apresentado na Figura 6. Já nos pacientes com talassemia, encontramos correlação entre as variações de LIC e de IST (Figura 9), variações de MIC e de TIBC Figura 10) e variações de T2* cardíaco e de TIBC (Figura 11).

Figura 6. Correlações entre as variações de LIC e dos exames de bioquímica em pacientes com doença falciforme.



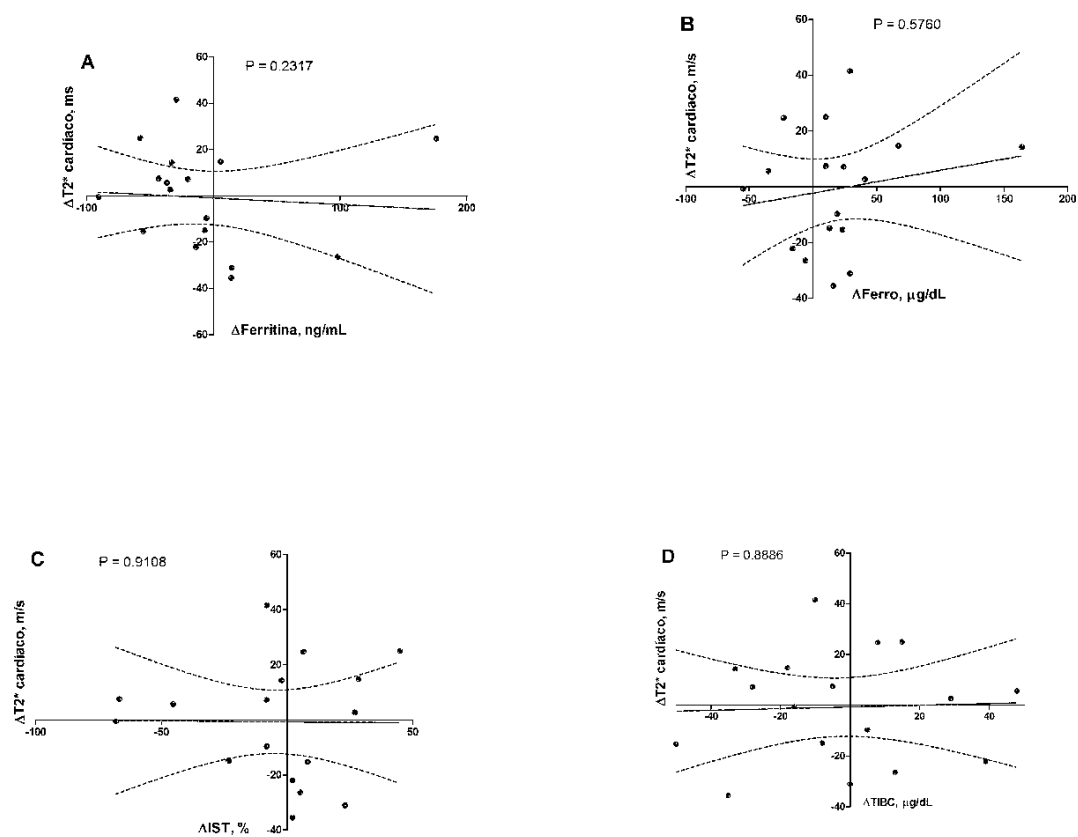
A, LIC e ferritina; B, LIC e ferro sérico; C, LIC e IST; D, LIC e TIBC.

Figura 7. Correlações entre as variações de MIC e dos exames de bioquímica em pacientes com doença falciforme .



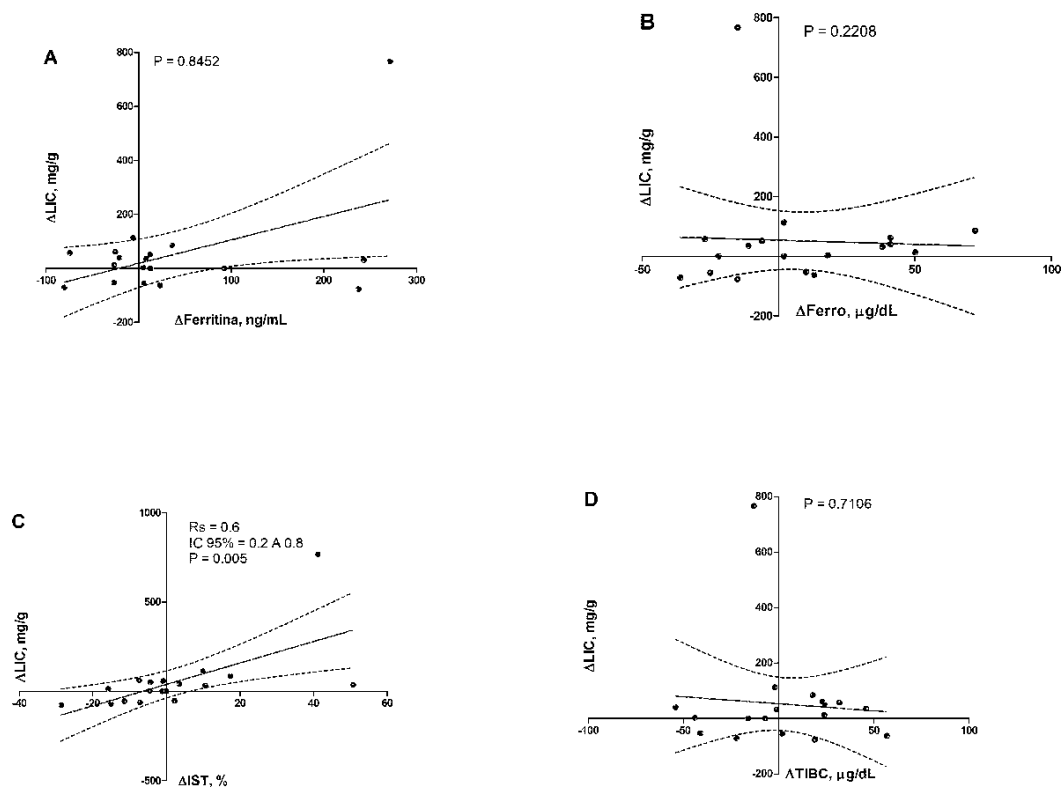
A, MIC e ferritina; B, MIC e ferro sérico; C, MIC e IST; D, MIC e TIBC.

Figura 8. Correlações entre variações de T2* cardíaco e dos exames de bioquímica em pacientes com doença falciforme .



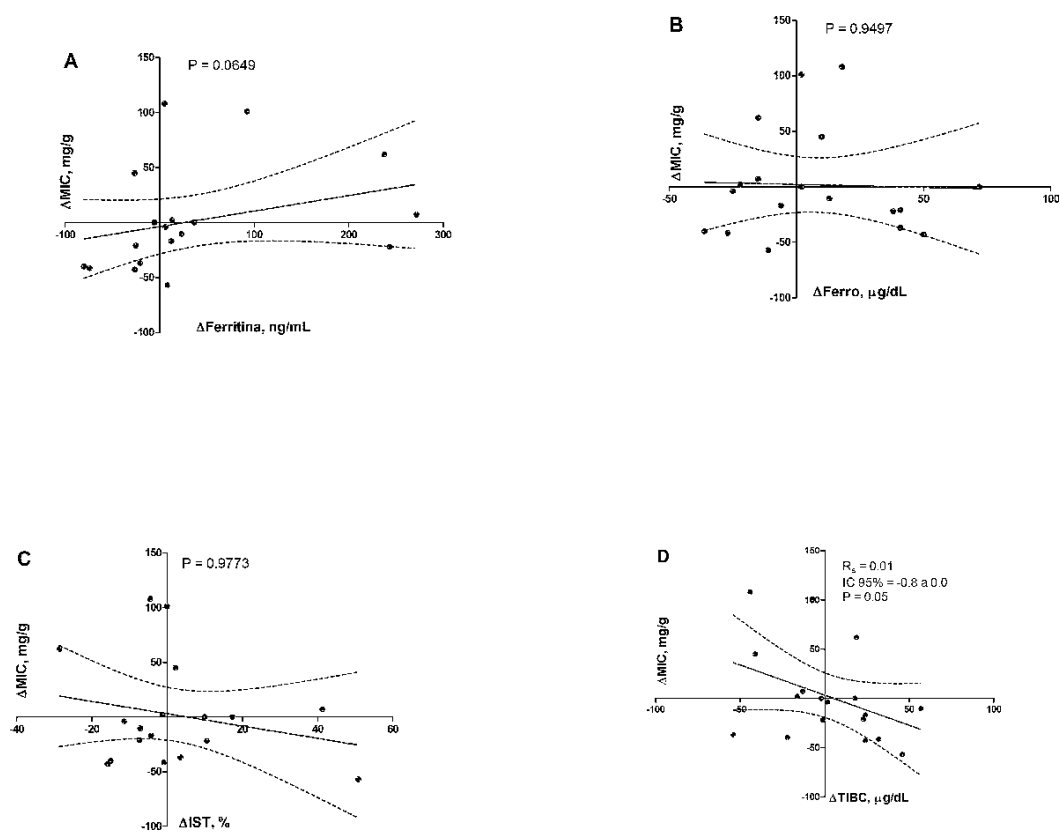
A, T2* cardíaco e ferritina; B, T2* cardíaco e ferro sérico; C, T2* cardíaco e IST; D, T2* cardíaco e TIBC.

Figura 9. Correlações entre variações de LIC e dos exames de bioquímica em pacientes com talassemia.



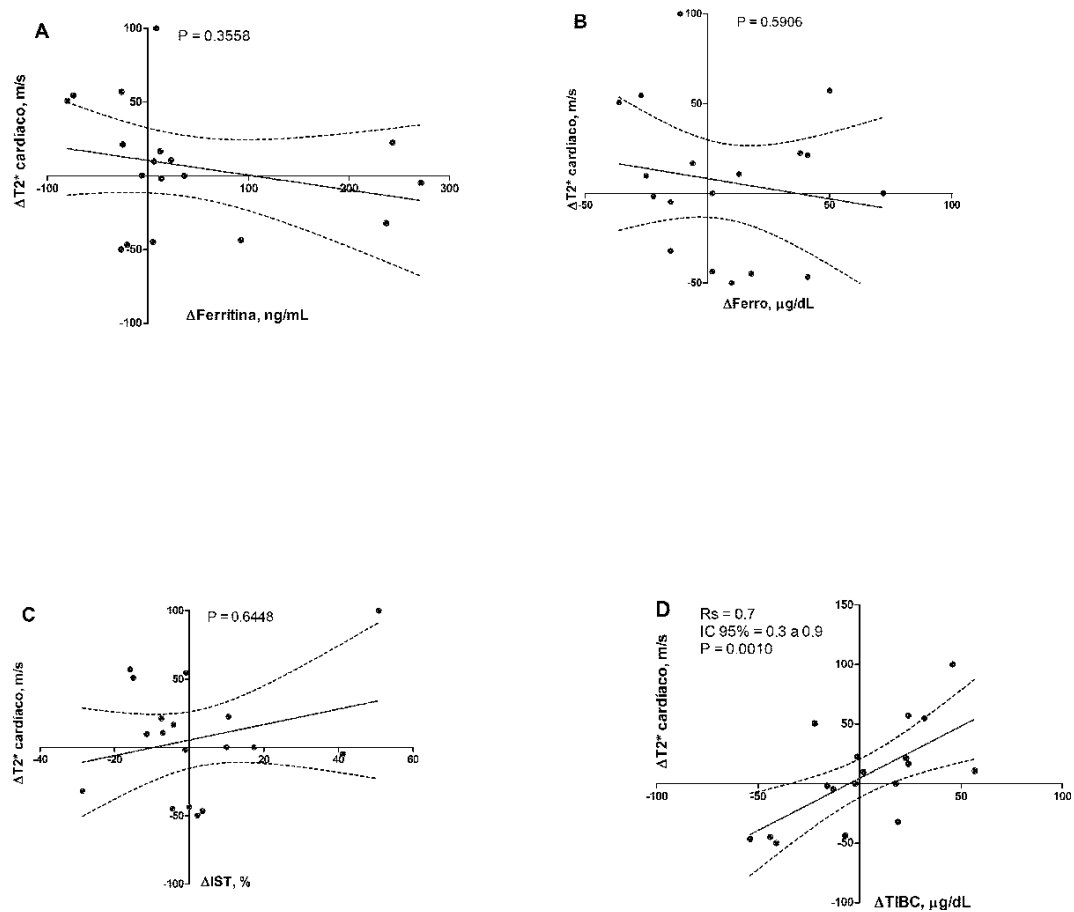
A, LIC e ferritina; B, LIC e ferro sérico; C, LIC e IST; D, LIC e TIBC.

Figura 10. Correlações entre variações de MIC e dos exames de bioquímica em pacientes com talassemia..



A, MIC e ferritina; B, MIC e ferro sérico; C, MIC e IST; D, MIC e TIBC.

Figura 11. Correlações entre as variações de T2* cardíaco e dos exames de bioquímica em pacientes com talassemia..



A, T2* cardíaco e ferritina; B, T2* cardíaco e ferro sérico; C, T2* cardíaco e IST; D, T2* cardíaco e TIBC.

DISCUSSÃO

O estudo apresentado observou diferenças entre pacientes com doença falciforme e talassemia quanto a sobrecarga de ferro de origem transfusional, e como essas diferenças se manifestam em exames laboratoriais e de imagem.

Os pacientes com DF apresentaram valores de hemácias, hemoglobina e hematócrito inferiores aos dos pacientes com talassemia, o que era esperado, pois os pacientes com talassemia são submetidos a maior aporte transfusional do que os pacientes com doenças falciformes, uma vez que o objetivo do regime regular de transfusão na talassemia é suprimir a atividade da medula óssea com maior concentração de hemoglobina (12). Nas doenças falciformes, apesar de se tentar manter um nível mínimo de hemoglobina, o objetivo principal é a redução dos níveis de hemoglobina S de forma a diminuir as complicações em decorrência da falcização das hemácias (13).

Quanto aos exames do perfil sérico de ferro, a ferritina máxima dos pacientes com doença falciforme foi quase o dobro da máxima dos pacientes com talassemia, possivelmente refletindo o perfil inflamatório do paciente mais grave do grupo. O índice de saturação da transferrina apresentou mediana acima dos valores de normalidade, sendo que no grupo talassêmico a mediana foi maior do que a dos pacientes com doença falciforme, sugerindo que os pacientes com talassemia têm sobrecarga de ferro mais grave do que os pacientes com doenças falciformes. Noetzli e colaboradores já haviam descrito uma sobrecarga de ferro tecidual maior nos pacientes com talassemia que nos pacientes com doença falciforme (14).

Os valores da mediana de LIC foram maiores que o triplo do estimado como valor de normalidade (abaixo de 2mg/g), refletindo um alto grau de sobrecarga de ferro hepática dos pacientes estudados. Um motivo para a gravidade da sobrecarga de ferro na população deste estudo pode ser o viés de seleção dos pacientes que tinham indicação clínica de sobrecarga de ferro tecidual. A amostra populacional utilizada é uma amostra de conveniência, ou seja, aquela disponível em nosso serviço, e não uma população aleatoriamente selecionada para avaliação por ressonância magnética. A dificuldade de

conseguir acesso ao exame de RM leva a necessidade de indicá-lo preferencialmente para os pacientes que tem histórico clínico com maior probabilidade de evoluir com sobrecarga (por exemplo, longo período de tratamento com transfusões, grande número de transfusões prévias, histórico de uso de quelação por diagnóstico prévio de sobrecarga de ferro, etc.). Assim, a população que teve acesso a RM é particularmente grave e isso se reflete nos dados apresentados.

Elevações do valor de MIC ou redução do T2* cardíaco sinalizando sobrecarga de ferro miocárdica foram raramente encontradas. O acúmulo primeiramente no fígado reflete o papel fisiológico deste órgão como estoque de ferro majoritário no organismo humano (15). Apenas um dos 25 pacientes do grupo doença falciforme e dois dos 11 pacientes do grupo talassemia apresentaram sobrecarga de ferro miocárdica. Apesar dos números serem pequenos e a diferença não ser estatisticamente significativa, isso parece sugerir que pacientes com talassemia possuem maior risco de sobrecarga de ferro no coração do que os pacientes com doenças falciformes. A ocorrência de sobrecarga de ferro no coração em pacientes com doença falciforme é muito rara e necessita de registros multicêntricos para melhor caracterização dos fatores de risco envolvidos em sua ocorrência (16).

O histórico transfusional dos pacientes com talassemia demonstrou que o volume de hemácias transfundido é muito maior que o utilizado em pacientes com DF. Esse achado é mais uma vez explicado porque no tratamento da talassemia com regime de transfusão regular, o alvo utilizado é o valor de hemoglobina, a fim de manter esses pacientes com níveis pré-transfusoriais de hemoglobina acima de 9g/dL, e pós-transfusional acima de 11g/dL (88). Na DF, o alvo utilizado geralmente é a porcentagem de HbS, de modo que esses pacientes são mantidos em níveis mais baixos de hemoglobina total. Para reduzir os níveis de HbS, também são utilizadas sangrias terapêuticas para remoção de HbS, realizando uma troca manual de hemácias, intercalando sangrias e transfusões, de modo que há algum grau de perda de ferro nos pacientes que são tratados com sangria, como observado nos 9 dos 25 pacientes com DF avaliados neste estudo. Essa perda de ferro não ocorre nos pacientes com talassemia, em quem não há indicação de troca de hemácias. Assim, pacientes

com talassemia recebem maior volume de hemácias e, portanto, maior aporte de ferro, o que leva a maior gravidade da sobrecarga de ferro se não for realizada terapia quelante adequada.

Ainda sobre o histórico transfusional, os pacientes com os maiores volumes de sangue transfundidos no grupo doença falciforme (0,0mL/kg/ano a 173mL/kg/ano) e no grupo talassemia (0,025mL/kg/ano a 288mL/kg/ano) apresentaram sobrecarga de ferro grave no miocárdio, sugerindo que, quanto maior o volume transfusional ao qual o paciente é submetido, maior seria o risco de acometimento do coração.

Somente o ferro sérico não apresentou correlação com LIC e T2* cardíaco. As dosagens de ferro sérico tiveram uma ampla distribuição de valores, sendo que esse analito varia muito de acordo com a terapia a qual o paciente está submetido. A dosagem de ferritina apresentou melhor correlação com LIC e com T2* cardíaco dentre os exames de bioquímica, corroborando que a ferritina sérica reflete indiretamente as quantidades de ferro estocado nos tecido (18).

Após os estudos de correlações, avaliamos a predição dos exames de bioquímica ao evento de sobrecarga de ferro tecidual pela RM. No caso da sobrecarga de ferro hepática, demonstrada por LIC acima de 2mg/g, a ferritina teve o melhor desempenho no teste, resultando em uma área sob a curva bem próximo a 1.0. Isso indica que a ferritina conseguiu predizer qualquer grau de sobrecarga de ferro hepática na população estudada, sendo que uma dosagem de 562,3ng/mL conseguiu predizer qualquer grau de sobrecarga de ferro hepática, com sensibilidade de 93,5% e especificidade de 88,9%. Ainda que esse valor esteja pouco acima dos valores de normalidade, o seu valor diagnóstico pode ser aumentado caso seja alinhado com a clínica do paciente, o histórico transfusional e o uso de terapia quelante. Na avaliação da sobrecarga de ferro miocárdica pelas curvas ROC, o índice de saturação da transferrina apresentou a maior área sob a curva com o melhor ponto da curva equivalente a uma dosagem de 95,4%. Ainda que seja um valor de saturação muito elevado, pacientes com saturação maior que 70% tendem a apresentar formas de ferro não ligadas à transferrina, como o NTBI (*non-transferrin bound iron*), que seriam as capazes de entrar no músculo cardíaco (19).

A análise dos dados pareados demonstrou que os pacientes com talassemia realizaram uma quantidade maior de exames de RM do que os pacientes com doença falciforme. Dada a natureza do alto volume empregado na terapia transfusional dos pacientes com talassemia, é natural que o exame de RM seja mais utilizado em pacientes com talassemia, sobretudo porque a terapia quelante é ajustada de acordo com os valores encontrados na RM.

Na análise da tendência de variação entre os analitos pareados, apenas a ferritina dos pacientes com doença falciforme espelhou a tendência de variação do LIC, o que corrobora com o que encontramos nas curvas ROC, reforçando que a ferritina pode ser utilizada como preditor de sobrecarga de ferro hepática. Nos pacientes com talassemia, apenas o TIBC refletiu a variação de MIC, sugerindo que, em populações com maior risco de evoluir com sobrecarga miocárdica, o TIBC pode ter valor de predição. Contudo, novos estudos em uma população maior podem auxiliar a elucidar o real papel do TIBC no acompanhamento dos pacientes com talassemia.

As variações em porcentagem de ferritina e IST foram necessárias para tornar a análise mais fidedigna à variação real desses analitos entre os exames pareados. Assim, observamos que, nos pacientes com doença falciforme, apenas a ferritina se correlacionou com o LIC, reforçando os achados anteriores e corroborando que as variações de ferritina sejam mais estáveis do que os outros exames de bioquímica no acompanhamento das variações de LIC do que nas variações de MIC e T2* cardíaco. Já no grupo de pacientes com talassemia, encontramos correlação de LIC com IST, o que pode ser explicado pelos altos valores desses dois parâmetros nos pacientes de grupo, indicando que o aumento de IST acompanha o aumento de LIC nesses pacientes. Diferentemente dos pacientes com doença falciforme, os valores de TIBC se correlacionaram com MIC e com T2* cardíaco, sugerindo que alterações de TIBC acompanham as variações do conteúdo de ferro miocárdico. Ainda assim, estudos conduzidos em um grupo maior de indivíduos podem auxiliar na avaliação do real valor do TIBC no seguimento dos pacientes com talassemia.

É importante ressaltar que este estudo apresenta um viés de seleção, pois os pacientes submetidos a RM tinham história clínica muito sugestiva de sobrecarga de ferro, com longo histórico transfusional ou até

mesmo histórico de quelação de ferro. Além disso, foi um grupo de estudo reduzido pela indisponibilidade da RM, o que prejudicou o poder estatístico das análises propostas. Ainda assim, os dados apresentados por esse estudo podem auxiliar na triagem clínica dos pacientes e auxiliar no uso racional do exame de RM, sobretudo para aqueles com dificuldade de acesso ao exame, reduzindo custos para o sistema público de saúde e otimizando o tratamento dos pacientes.

CONCLUSÃO:

Neste estudo, demonstramos que diferentes apresentações de sobrecarga de ferro nas hemoglobinopatias estão associadas com diferenças na terapia transfusional e possivelmente são causadas por diferenças na fisiopatologia dessas doenças. Ainda que o estudo tenha sido conduzido em um pequeno grupo de pacientes, nossos dados sugerem, que em locais com acesso limitado a RM, os valores de ferritina e IST podem ser úteis na exclusão de pacientes com menor risco de sobrecarga de ferro, e que variações na ferritina e TIBC podem ser úteis para decisão sobre indicação de RM durante o tratamento.

REFERÊNCIAS:

1. YUN, Seongseok; VINCELETTE, Nicole D. Update on iron metabolism and molecular perspective of common genetic and acquired disorder, hemochromatosis. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 95, n. 1, p. 12-25, 2015.
2. Hoffbrand, V. and Moss, P. (2011). *Essential Haematology*. Somerset: Wiley.
3. CARPENTER, J. P. et al. On T2* Magnetic Resonance and Cardiac Iron. **Circulation**, [s.l.], v. 123, n. 14, p.1519-1528, 2011.
4. Allali S, de Montalembert M, Brousse V, Chalumeau M, Karim Z. Management of iron overload in hemoglobinopathies. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2017;24(3):223-226.

5. PAULING, Linus et al. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. **Hematology: Landmark Papers of the Twentieth Century**, v. 110, p. 459, 2000.
6. DE GALIZA NETO, Gentil Claudino; DA SILVA PITOMBEIRA, Maria. Aspectos moleculares da anemia falciforme. 2003.
7. VERISSIMO, Monica Pinheiro de Almeida et al. Brazilian Thalassemia Association protocol for iron chelation therapy in patients under regular transfusion. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. 6, p. 428-434, 2013.
8. QUATRE, A. et al. MRI monitoring of myocardial iron overload: use of cardiac MRI combined with hepatic MRI in a cohort of multi-transfused patients with thalassaemia. **Diagnostic and Interventional Imaging**, v. 95, n. 11, p. 1065-1069, 2014.
9. Cappellini MD, Cohen A, Eleftheriou A, et al. Guidelines for the Clinical Management of Thalassaemia [Internet]. 2nd Revised edition. Nicosia (CY): Thalassaemia International Federation; 2008. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK173968/>
10. WALLACH, Jacques Burton. **Interpretation of Diagnostic Tests**. Lippincott Williams & Wilkins, 2007
11. HANKINS, J. S. et al. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. **Blood**, [s.l.], v. 113, n. 20, p.4853-4855, 2009
12. FARMAKIS, Dimitrios; ANGASTINIOTIS, Michael; ELEFThERIOU, Androulla. **A Short Guide for the Management of Transfusion Dependent Thalassaemia (TDT)**, Nicosya, 2014, 113p. ISBN 978-9963-717-12-5.
13. BUCHANAN, George R; YAMN, Barbara P. **Evidence-Based Management of Sickle Cell Disease**. Bethesda, 2014, 161p.
14. Noetzli LJ, Coates TD, Wood JC. Pancreatic iron loading in chronically transfused sickle cell disease is lower than in thalassaemia major. *British journal of haematology*. 2011;152(2):229-33
15. Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfusion clinique et biologique: journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2017;24(3):115-9.

16. Tavares AHJ, Benites BD, Fertrin KY. Myocardial Iron Overload in Sickle Cell Disease: A Rare But Potentially Fatal Complication of Transfusion. *Transfusion medicine reviews*. 2019;33(3):170-5.
17. Taher AT, Cappellini MD. Management of non-transfusion-dependent thalassemia: a practical guide. *Drugs*. 2014;74(15):1719-29 %@ 0012-6667.
18. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1800(8):760-9.
19. Dev S, Babitt JL. Overview of iron metabolism in health and disease. *Hemodialysis international International Symposium on Home Hemodialysis*. 2017;21 Suppl 1:S6-S20.

5. DISCUSSÃO GERAL

Nessa dissertação de mestrado, avaliamos o perfil de ferro em pacientes com doença falciforme e talassemia, submetidos a transfusão em acompanhamento no Hemocentro Campinas. Utilizamos os exames de ressonância magnética como parâmetro para avaliar se os exames de ferritina, ferro sérico, TIBC e IST poderiam ter valor no acompanhamento desses pacientes, a fim de racionalizar o exame de ressonância magnética, sobretudo em locais onde esse exame não é acessível à população e, por isso, deve ser indicado para os pacientes que tenham maior urgência na avaliação do conteúdo de ferro tecidual.

Observamos que a sobrecarga de ferro miocárdica em pacientes com doença falciforme é extremamente rara, mas pode ter consequências fatais, como demonstrado no primeiro artigo desta dissertação. Alguns fatores contribuíram para que o indivíduo em questão apresentasse essa complicação, mas a baixa adesão à terapia quelante, aliada ao alto volume transfusional empregado durante toda a vida da paciente são os fatores preponderantes para o desfecho do caso. Isso indica que os pacientes devem ser avaliados individualmente, para que possam ser traçadas as melhores estratégias de tratamento e, assim, reduzir as chances de óbito precoce.

Países em desenvolvimento, tais como o Brasil, possuem dificuldade em disponibilizar o exame de RM para toda a população. No caso específico do Brasil, o grande território aliado à enorme população dificulta ainda mais o acesso a esse exame. Além disso, a doença falciforme acomete, em sua maioria, pessoas de baixo nível socioeconômico, que terão maior dificuldade em procurar grandes centros para o uso da RM ou que não terão condições financeiras para realizar o exame em serviços médicos privados. Assim, as conclusões deste estudo podem futuramente ter valor na triagem dos pacientes para otimizar o uso dos exames de RM, potencialmente auxiliando na diminuição dos custos diretos para o sistema público de saúde e priorizando diagnóstico e monitoramento dos pacientes mais graves, possivelmente aumentando a chance de sobrevida dos pacientes com sobrecarga de ferro tecidual.

Outros estudos são necessários para avaliar a utilidade dos exames de bioquímica na predição da sobrecarga de ferro demonstrada por RM,

sobretudo em populações maiores. Também pode ser de interesse que isso seja avaliado em outras doenças que causam sobrecarga de ferro, como, por exemplo, nas hemocromatoses hereditárias, pois diferenças na fisiopatologia das doenças podem interferir na maneira com que esses analitos se comportam no organismo do indivíduo em relação a achados na ressonância magnética.

6. CONCLUSÕES

- Em comparação com os pacientes com doença falciforme, os pacientes com talassemia apresentaram níveis maiores de hemoglobina e de alterações bioquímicas de sobrecarga de ferro, tais como elevação da ferritina, ferro sérico e IST, em associação com um maior volume transfusional e maior prevalência do uso de terapia quelante;
- Estudos de ressonância magnética identificaram mais pacientes com sobrecarga de ferro hepática e doença falciforme, porém um maior número de pacientes com sobrecarga de ferro cardíaca e talassemia;
- A sobrecarga de ferro cardíaca é extremamente rara na doença falciforme, potencialmente fatal, e parece estar associada a grande volume transfusional e falta de adesão a terapia quelante;
- Na população deste estudo, valores de ferritina abaixo de 562ng/mL excluíram sobrecarga de ferro hepática com sensibilidade de 93,5% e especificidade de 88,9%, e valores de IST abaixo de 95,4% excluíram sobrecarga de ferro miocárdica com sensibilidade de 89,1% e especificidade de 45%, podendo ser úteis na otimização do uso de RM;
- A variação dos níveis de ferritina se correlacionou melhor com a variação dos valores de concentração hepática de ferro (LIC) nos pacientes com doença falciforme, enquanto a variação da capacidade total de ligação a transferrina (TIBC) se correlacionou melhor com a variação dos valores de concentração miocárdica de ferro (MIC) nos pacientes com talassemia, mostrando que os exames bioquímicos podem ser úteis no monitoramento dos pacientes em tratamento de sobrecarga de ferro;

7. REFERÊNCIAS

1. Daher R, Karim Z. Iron metabolism: State of the art. *Transfusion clinique et biologique : journal de la Societe francaise de transfusion sanguine*. 2017;24(3):115-9.
2. Wang X, Thein SL. Switching from fetal to adult hemoglobin. *Nature genetics*. 2018;50(4):478-80.
3. Kohne E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Arzteblatt international*. 2011;108(31-32):532-40.
4. Vichinsky E. Consensus document for transfusion-related iron overload. *Seminars in hematology*. 2001;38(1 Suppl 1):2-4.
5. Trumbo P, Yates AA, Schlicker S, Poos M. Dietary reference intakes: vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. *Journal of the American Dietetic Association*. 2001;101(3):294-301.
6. Review of WIC Food Packages: Improving Balance and Choice: Final Report. Washington (DC)2017.
7. Vandevijvere S, Michels N, Verstraete S, Ferrari M, Leclercq C, Cuenca-Garcia M, et al. Intake and dietary sources of haem and non-haem iron among European adolescents and their association with iron status and different lifestyle and socio-economic factors. *European journal of clinical nutrition*. 2013;67(7):765-72.
8. Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, et al. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. 1997;388(6641):482-8.
9. Romero MF, Hediger MA, Boulpaep EL, Boron WF. Expression cloning and characterization of a renal electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *Nature*. 1997;387(6631):409- 13.
10. Yanatori I, Kishi F. DMT1 and iron transport. *Free radical biology & medicine*. 2018.
11. McKie AT, Barrow D, Latunde-Dada GO, Rolfs A, Sager G, Mudaly E, et al. An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. *Science*. 2001;291(5509):1755-9.
12. Mackenzie B, Hediger MA. SLC11 family of H⁺-coupled metal-ion transporters NRAMP1 and DMT1. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):571-9.
13. Vulpe CD, Kuo YM, Murphy TL, Cowley L, Askwith C, Libina N, et al. Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. *Nature genetics*. 1999;21(2):195-9.
14. Mackenzie B, Garrick MD. Iron Imports. II. Iron uptake at the apical membrane in the intestine. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005;289(6):G981-6.
15. Holmberg CG, Laurell CB. Investigations in serum copper; nature of serum copper and its relation to the iron-binding protein in human serum. *Acta chemica Scandinavica*. 1947;1(10):944-50.
16. Jandl JH, Inman JK, Simmons RL, Allen DW. Transfer of iron from serum iron-binding protein to human reticulocytes. *The Journal of clinical investigation*. 1959;38(1, Part1):161-85.
17. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free radical biology & medicine*. 2018.
18. Aisen P. Transferrin receptor 1. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2004;36(11):2137-43.
19. Kawabata H, Sakamoto S, Masuda T, Uchiyama T, Ohmori K, Koeffler HP, et al. Roles of transferrin receptors in erythropoiesis. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2016;57(7):951-8.

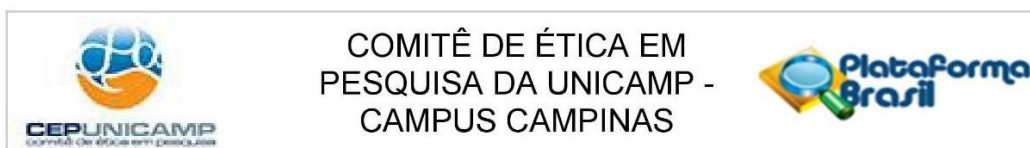
20. Kleven MD, Jue S, Enns CA. Transferrin Receptors TfR1 and TfR2 Bind Transferrin through Differing Mechanisms. *Biochemistry*. 2018;57(9):1552-9.
21. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV. Serum ferritin: Past, present and future. *Biochimica et biophysica acta*. 2010;1800(8):760-9.
22. Laufberger V. Sur la cristallisation de la ferritine. *Bulletin de la Société de chimie biologique*. 1937;19:1575-82.
23. Jacobs A, Worwood M. Iron in biochemistry and medicine: Academic Press Inc. (London) Ltd, 24/28 Oval Road, London N.W.I.; 1974. xiv + 769 pp. p.
24. Ganz T, Nemeth E. Iron sequestration and anemia of inflammation. *Seminars in hematology*. 2009;46(4):387-93.
25. Andersen CBF, Stodkilde K, Saederup KL, Kuhlee A, Raunser S, Graversen JH, et al. Haptoglobin. *Antioxidants & redox signaling*. 2017;26(14):814-31.
26. Shih AW, McFarlane A, Verhovsek M. Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *American journal of hematology*. 2014;89(4):443-7.
27. Kristiansen M, Graversen JH, Jacobsen C, Sonne O, Hoffman HJ, Law SK, et al. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature*. 2001;409(6817):198-201.
28. Tolosano E, Altruda F. Hemopexin: structure, function, and regulation. *DNA and cell biology*. 2002;21(4):297-306.
29. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. *Frontiers in physiology*. 2014;5:415.
30. Tolosano E, Fagoonee S, Morello N, Vinchi F, Fiorito V. Heme scavenging and the other facets of hemopexin. *Antioxidants & redox signaling*. 2010;12(2):305-20.
31. Nutrition classics. *Acta Chemica Scandinavica*, Volume 1, 1947: The iron-binding protein of swine serum. By C. B. Laurell and B. Ingelman. *Nutrition reviews*. 1985;43(7):209-11.
32. Sonati Mde F, Costa FF. The genetics of blood disorders: hereditary hemoglobinopathies. *Jornal de pediatria*. 2008;84(4 Suppl):S40-51.
33. Savitt TL, Goldberg MF. Herrick's 1910 case report of sickle cell anemia. The rest of the story. *Jama*. 1989;261(2):266-71.
34. Herrick JB. Peculiar elongated and sickle-shaped red blood corpuscles in a case of severe anemia. 1910. *The Yale journal of biology and medicine*. 2001;74(3):179-84.
35. Hahn E, Gillespie E. Sickle cell anemia: Report of a case greatly improved by splenectomy. experimental study of sickle cell formation. *Archives of Internal Medicine*. 1927;39(2):233-54.
36. Frenette PS, Atweh GF. Sickle cell disease: old discoveries, new concepts, and future promise. *The Journal of clinical investigation*. 2007;117(4):850-8.
37. Sherman I. The sickling phenomenon, with special reference to the differentiation of sickle cell anemia from the sickle cell trait. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 1940;67(309):19.
38. Serjeant GR, Vichinsky E. Variability of homozygous sickle cell disease: The role of alpha and beta globin chain variation and other factors. *Blood cells, molecules & diseases*. 2018;70:66- 77.
39. WATSON J. A STUDY OF SICKLING OF YOUNG ERYTHROCYTES IN SICKLE CELL ANEMIA. *Blood*. 1948;3(4):465-9.
40. Antwi-Boasiako C, Frimpong E, Ababio G, Dzudzor B, Ekem I, Gyan B, et al. Sickle cell disease: reappraisal of the role of foetal haemoglobin levels in the frequency of vaso-occlusive crisis. *Ghana medical journal*. 2015;49(2):102-6.
41. Pauling L, Itano HA, Singer SJ, Wells IC. Sickle Cell Anemia, a Molecular Disease. *Science*. 1949;110(2865):543-8.
42. Williams TN, Thein SL. Sickle Cell Anemia and Its Phenotypes. *Annual review of genomics and human genetics*. 2018(0).
43. Ingram VM. A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anaemia haemoglobin. *Nature*. 1956;178(4537):792-4.

44. Ballas SK. Sick cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2018;68(2-3):105-28.
45. Hunt JA, Ingram VM. Abnormal human haemoglobins: II. The chymotryptic digestion of the trypsin-resistant "core" of haemoglobins A and S. *Biochimica et biophysica acta*. 1958;28:546-9.
46. Johnson FL, Look AT, Gockerman J, Ruggiero MR, Dalla-Pozza L, Billings FT. Bone-Marrow Transplantation in a Patient with Sick Cell Anemia. *New England Journal of Medicine*. 1984;311(12):780-3.
47. Bhatia M, Sheth S. Hematopoietic stem cell transplantation in sick cell disease: patient selection and special considerations. *Journal of blood medicine*. 2015;6:229-38.
48. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, McMahon RP, Barton FB, et al. Design of the multicenter study of hydroxyurea in sick cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea. *Controlled clinical trials*. 1995;16(6):432-46.
49. Charache S, Terrin ML, Moore RD, Dover GJ, Barton FB, Eckert SV, et al. Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sick cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sick Cell Anemia. *The New England journal of medicine*. 1995;332(20):1317-22.
50. Piel FB, Patil AP, Howes RE, Nyangiri OA, Gething PW, Dewi M, et al. Global epidemiology of sick cell haemoglobin in neonates: a contemporary geostatistical model-based map and population estimates. *Lancet*. 2013;381(9861):142-51.
51. Weatherall DJ. The inherited diseases of hemoglobin are an emerging global health burden. *Blood*. 2010;115(22):4331-6.
52. Carneiro-Proietti ABF, Kelly S, Miranda Teixeira C, Sabino EC, Alencar CS, Capuani L, et al. Clinical and genetic ancestry profile of a large multi-centre sick cell disease cohort in Brazil. *British journal of haematology*. 2018;182(6):895-908.
53. Lervolino LG, Baldin PE, Picado SM, Calil KB, Viel AA, Campos LA. Prevalence of sick cell disease and sick cell trait in national neonatal screening studies. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2011;33(1):49-54.
54. Arduini GA, Rodrigues LP, Trovo de Marqui AB. Mortality by sick cell disease in Brazil. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. 2017;39(1):52-6.
55. Sabarense AP, Lima GO, Silva LM, Viana MB. Survival of children with sick cell disease in the comprehensive newborn screening programme in Minas Gerais, Brazil. *Paediatrics and international child health*. 2015;35(4):329-32.
56. Brandelise S, Pinheiro V, Gabetta CS, Hambleton I, Serjeant B, Serjeant G. Newborn screening for sick cell disease in Brazil: the Campinas experience. *Clinical and laboratory haematology*. 2004;26(1):15-9.
57. Vekilov PG. Sick-cell haemoglobin polymerization: is it the primary pathogenic event of sick-cell anaemia? *British journal of haematology*. 2007;139(2):173-84.
58. Damanhour GA, Jarullah J, Marouf S, Hindawi SI, Mushtaq G, Kamal MA. Clinical biomarkers in sick cell disease. *Saudi journal of biological sciences*. 2015;22(1):24-31.
59. Quinn CT, Smith EP, Arbabi S, Khera PK, Lindsell CJ, Niss O, et al. Biochemical surrogate markers of hemolysis do not correlate with directly measured erythrocyte survival in sick cell anemia. *American journal of hematology*. 2016;91(12):1195-201.
60. Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L, et al. Sick cell disease. *Nature reviews Disease primers*. 2018;4:18010.
61. Poillon WN, Kim BC, Labotka RJ, Hicks CU, Kark JA. Antisickling effects of 2,3-diphosphoglycerate depletion. *Blood*. 1995;85(11):3289-96.
62. Bertrand R. Nitric oxide-mediated suppression of 2,3-bisphosphoglycerate synthesis: therapeutic relevance for environmental hypoxia and sick cell disease. *Medical hypotheses*. 2012;79(3):315-8.

63. Goodman SR. The irreversibly sickled cell: a perspective. *Cellular and molecular biology*. 2004;50(1):53-8.
64. Evans EA, Mohandas N. Membrane-associated sickle hemoglobin: a major determinant of sickle erythrocyte rigidity. *Blood*. 1987;70(5):1443-9.
65. Elion J, Laurance S, Lapoumeroulie C. [Pathophysiology of sickle cell disease]. *Medecine tropicale : revue du Corps de sante colonial*. 2010;70(5-6):454-8.
66. Kuypers FA. Hemoglobin s polymerization and red cell membrane changes. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2014;28(2):155-79.
67. Ohene-Frempong K, Weiner SJ, Sleeper LA, Miller ST, Embury S, Moohr JW, et al. Cerebrovascular accidents in sickle cell disease: rates and risk factors. *Blood*. 1998;91(1):288-94.
68. Desai PC, Ataga KI. The acute chest syndrome of sickle cell disease. Expert opinion on pharmacotherapy. 2013;14(8):991-9.
69. Stuart MJ, Setty BN. Sickle cell acute chest syndrome: pathogenesis and rationale for treatment. *Blood*. 1999;94(5):1555-60.
70. Gravitz L, Pincock S. Sickle-cell disease. *Nature*. 2014;515(7526):S1.
71. Sullivan KJ, Kissoon N, Gauger C. Nitric oxide metabolism and the acute chest syndrome of sickle cell anemia. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies*. 2008;9(2):159-68.
72. McClish DK, Smith WR, Dahman BA, Levenson JL, Roberts JD, Penberthy LT, et al. Pain site frequency and location in sickle cell disease: the PiSCES project. *Pain*. 2009;145(1-2):246-51.
73. Levenson JL, McClish DK, Dahman BA, Bovbjerg VE, de ACV, Penberthy LT, et al. Depression and anxiety in adults with sickle cell disease: the PiSCES project. *Psychosomatic medicine*. 2008;70(2):192-6.
74. Chou ST, Fasano RM. Management of Patients with Sickle Cell Disease Using Transfusion Therapy: Guidelines and Complications. *Hematology/oncology clinics of North America*. 2016;30(3):591-608.
75. Galanello R, Origa R. Beta-thalassemia. *Orphanet journal of rare diseases*. 2010;5:11.
76. Cooley TB, Witwer ER, Lee P. Anemia in children with splenomegaly and peculiar changes in the bones 1927. 347-63 p.
77. Whipple GH, Bradford WL. Mediterranean disease-thalassemia (Erythroblastic anemia of cooley). *The Journal of Pediatrics*. 1936;9(3):279-311.
78. Premawardhena A, Fisher C, Fathi F, De Silva S, Perera W, Peto T, et al. Genetic determinants of jaundice and gallstones in haemoglobin E β thalassaemia. *The Lancet*. 2001;357(9272):1945-6.
79. SMITH CH, ERLANDSON ME, STERN G, SCHULMAN I. The Role of Splenectomy in the Management of Thalassemia. *Blood*. 1960;15(2):197-211.
80. Taher AT, Weatherall DJ, Cappellini MD. Thalassaemia. *Lancet*. 2018;391(10116):155-67.
81. Coates TD, Wood JC. How we manage iron overload in sickle cell patients. *British journal of haematology*. 2017;177(5):703-16.
82. Wallach JB. Interpretation of diagnostic tests: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
83. St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK, et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*. 2005;105(2):855-61.
84. Carpenter JP, He T, Kirk P, Roughton M, Anderson LJ, de Noronha SV, et al. On T2* magnetic resonance and cardiac iron. *Circulation*. 2011;123(14):1519-28.
85. Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA, et al. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*. 2009;113(20):4853-5.
86. Cohen AR, Galanello R, Piga A, De Sanctis V, Tricta F. Safety and effectiveness of long- term therapy with the oral iron chelator deferiprone. *Blood*. 2003;102(5):1583-7.

87. Nick H, Acklin P, Lattmann R, Buehlmayr P, Hauffe S, Schupp J, et al. Development of tridentate iron chelators: from desferrithiocin to ICL670. *Current medicinal chemistry*. 2003;10(12):1065-76.
88. Taher AT, Cappellini MD. Management of non-transfusion-dependent thalassemia: a practical guide. *Drugs*. 2014;74(15):1719-29 %@ 0012-6667.

ANEXO 1 – PARECER CEP/FCM UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Comparação entre marcadores laboratoriais de ferrocinética e medida de ferro tecidual por ressonância magnética em pacientes com sobrecarga de ferro transfusional

Pesquisador: KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57832616.1.0000.5404

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.656.762

Apresentação do Projeto:

Resumo:

O ferro possui papel de grande importância na sobrevivência e multiplicação celular por ser parte integrante do grupamento heme, presente em proteínas como hemoglobina, mioglobina, citocromos, e por atuar na regulação de atividade enzimáticas e nas reações de oxidação-redução. Ele é transportado na corrente sanguínea pela transferrina e estocado ligado à ferritina. Quando se encontra em excesso no organismo, o ferro pode gerar dano tecidual em órgãos como coração e fígado. A causa mais frequente de sobrecarga de ferro na prática clínica é a terapia transfusional, uma vez que não há mecanismo fisiológico para eliminar o excesso de ferro do corpo humano. Pacientes com anemias crônicas graves são dependentes de transfusão e recebem tratamento com quelantes de ferro para tratar sobrecarga de ferro. Pode-se acompanhar o conteúdo de ferro no organismo utilizando exames laboratoriais e de imagem. Embora o padrão-ouro tenha sido, por muito tempo, a medida direta do ferro tecidual através de biópsia hepática ou miocárdica, atualmente, é preconizado monitorar esses pacientes com exames não-invasivos, tais como a dosagem de marcadores de ferrocinética (ferro sérico, ferritina sérica, capacidade total de ligação de ferro e saturação de transferrina sérica) e o cálculo do conteúdo de ferro hepático e cardíaco por ressonância magnética pelo método T2*. Como a presença de

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

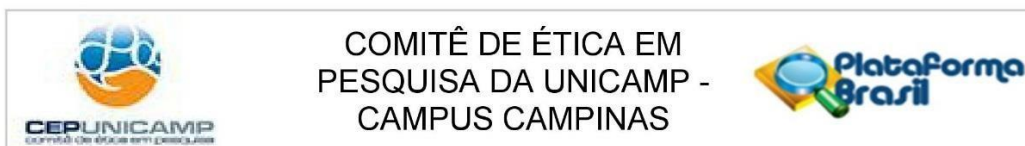
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.656.762

processos inflamatórios pode interferir transitoriamente com as medidas dos marcadores séricos, variações nesses marcadores podem levar a falsa ideia de piora ou melhora da sobrecarga de ferro em comparação com os dados obtidos por ressonância magnética, resultando, por exemplo, em ajustes desnecessários da terapia quelante. Esse estudo objetiva avaliar a contribuição da dosagem de marcadores de ferrocínica em pacientes acompanhados por sobrecarga de ferro com ressonância magnética. Será realizada coleta de dados de prontuários de uma coorte retrospectiva de pacientes em acompanhamento por sobrecarga de ferro no HC-UNICAMP que tenham realizado exames de ressonância magnética e dosagens de marcadores séricos de ferrocínica. Os dados serão analisados em software estatístico GraphPad Prism 6.0 para determinar os valores preditivos dos marcadores séricos para variação do ferro tecidual detectado por exame de imagem, para definir qual a contribuição do uso desses exames laboratoriais em associação com a ressonância magnética.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a acurácia dos exames laboratoriais de ferrocínica para a predição de alterações do conteúdo de ferro hepático e cardíaco determinados por ressonância magnética em pacientes em tratamento de sobrecarga de ferro.

Objetivo Secundário:

Estudar a associação entre a acurácia dos exames com dados clínicos (demográficos, dose e tipo de quelante de ferro, doença de base)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos para os sujeitos da pesquisa, pois se trata de um levantamento de dados de prontuário médico

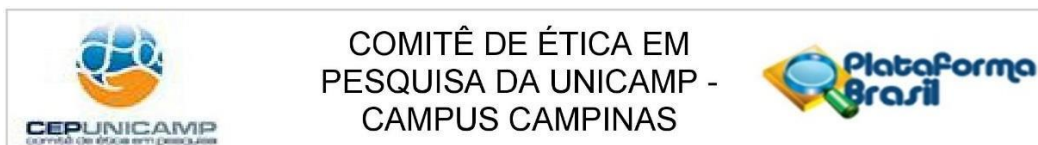
Benefícios:

Não há benefícios para os sujeitos da pesquisa. Esse estudo poderá trazer conhecimentos úteis para o manejo de pacientes com diagnóstico semelhante no futuro, sobre a necessidade ou não de seguimento com exames laboratoriais de ferrocínica desses pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma pesquisa retrospectiva de levantamento de informações dos prontuários. Serão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.656.762

analisados 20 indivíduos de ambos os sexos que tiveram diagnóstico de sobrecarga de ferro confirmado através de: 1) ferritina sérica e saturação de transferrina acima dos valores de referência; e/ou 2) ressonância magnética com elevação do conteúdo de ferro hepático (acima de 2mg/g) ou cardíaco (T2* abaixo de 20ms) e que realizaram pelo menos um exame de ressonância magnética T2* com avaliação do conteúdo de ferro hepático e cardíaco.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de rosto: devidamente preenchida e assinada;

Comprovante de vínculo: recomendações;

Projeto original: adequado;

Cronograma: adequado;

Orçamento: adequado;

TCLE: solicitação de dispensa adequada.

Recomendações:

Comprovante de vínculo: recomendo inserir a plataforma Brasil um comprovante de vínculo com a instituição.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O sujeito de pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

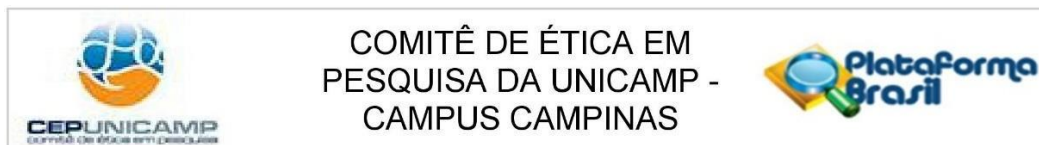
UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.656.762

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, “cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento”.

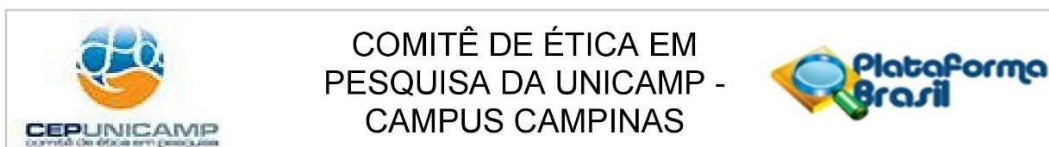
Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_752254.pdf	10/07/2016 19:55:02		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	solicitacaodispensaTCLE.pdf	07/07/2016 17:30:59	KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoAlvaroTavaresPlatBR.pdf	07/07/2016 17:19:38	KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRostoAlvaroTavaresPlataformaBrasil.pdf	06/07/2016 16:42:00	KLEBER YOTSUMOTO FERTRIN	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.656.762

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 01 de Agosto de 2016

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador)

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



3/26/2020 13:23

Researcher Support <support@elsevier.com>

Re: Request for use on Ms.C. dissertation [200110-015740]

Para alvarohenriquez@hotmail.com

Dear Mr. Junqueira Tavares,

Article reference: YTMRV50572

Thank you for your enquiry.

I understand that you would like to use your article for academic use for your University.

I can confirm that that you can use their articles, in full or in part, for a wide range of scholarly, non-commercial purposes one of which is inclusion in a thesis or dissertation. See the following link for further information on this

<https://www.elsevier.com/about/our-business/policies/copyright/personal-use>

As you will be able to see from the above link, our policy is to allow authors to use their work in their thesis or dissertation (provided that this is not to be published commercially).

Therefore, I can confirm that you can make it publicly available on your university web site/repository for non-commercial use.

If you require further clarification please contact permissions@elsevier.com who will be able to help.

Please let me know if I can be of further assistance.

Kind regards,

Reymart Golondrina
Researcher Support
ELSEVIER