

MICHELE LEAL VIEIRA JACOB

ANEMIA EM PACIENTES COM CÂNCER:
Papel da atividade inflamatória sobre a eritropoiese
e metabolismo do ferro

CAMPINAS

2007

MICHELE LEAL VIEIRA JACOBER

ANEMIA EM PACIENTES COM CÂNCER:

Papel da atividade inflamatória sobre a eritropoiese
e metabolismo do ferro

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

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

CO-ORIENTADORA: *Prof^a Dr^a CARMEN SILVIA PASSOS LIMA*

CAMPINAS

2007

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

J15a Jacober, Michele Leal Vieira
 Anemia em pacientes com câncer: papel da atividade inflamatória
 sobre a eritropoiese e metabolismo do ferro / Michele Leal Vieira
 Jacober. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

 Orientadores: Helena Zerlotti Wolf Grotto; Carmen Silvia Passos
 Lima

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

 1. Anemia. 2. Citocinas. 3. Câncer. I. Grotto, Helena
 Zerlotti Wolf. II. Lima, Carmen Silvia Passos. II. Universidade
 Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

**Título em inglês : Anemia in cancer patients: inflammatory activity in
erythropoiesis and iron metabolism**

Keywords: • Anemia
 • Cytokines
 • Cancer

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

**Banca examinadora: Profª Drª Helena Zerlotti Wolf Grotto
 Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara
 Profª Drª Sandra Cecília Botelho Costa**

Data da defesa: 07-02-2007

UNIDADE	BC
Nº CHAMADA:	TUNICAMP
	J15a
V. _____ Ed. _____	
TOMBO BC/	72701
PROC.	16.145-07
C <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>	
PREÇO	110
DATA	23/05/07
BIB-ID	412115

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

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

J15a

Jacober, Michele Leal Vieira

Anemia em pacientes com câncer: papel da atividade inflamatória sobre a eritropoiese e metabolismo do ferro / Michele Leal Vieira
Jacober. Campinas, SP : [s.n.], 2007.

Orientadores: Helena Zerlotti Wolf Grotto; Carmen Silvia Passos Lima

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

1. Anemia. 2. Citocinas. 3. Câncer. I. Grotto, Helena Zerlotti Wolf. II. Lima, Carmen Silvia Passos. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês : Anemia in cancer patients: inflammatory activity in erythropoiesis and iron metabolism

Keywords: • Anemia
• Cytokines
• Cancer

Área de concentração : Ciências Biomédicas

Titulação: Mestrado em Ciências Médicas

**Banca examinadora: Profª Drª Helena Zerlotti Wolf Grotto
Profª Drª Elvira Maria Guerra Shinohara
Profª Drª Sandra Cecília Botelho Costa**

Data da defesa: 07-02-2007

DEDICATÓRIA

*À Cesar,
verdadeiro amor que Deus colocou em minha vida.*

*A toda minha família
por entender a dor da distância.*

*Ao Grande Arquiteto do Universo
que permite todos os dias desbastar a pedra bruta e
à todos os pacientes voluntários que
dia a dia lutam pela vida ...*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Helena Zerlotti Wolf Grotto pelo constante apoio, incentivo e dedicação na orientação desse trabalho.

À Prof^a Dr^a Carmen Silvia Passos Lima pela contribuição na co-orientação desse trabalho.

Aos Professores e funcionários do Departamento de Patologia Clínica, em especial aos do Setor de Hematologia, Coleta, Bioquímica, Urinálise e Fisiologia, indispensáveis para a realização desse trabalho.

Aos professores e funcionários do Laboratório de Imunologia Celular, em especial ao funcionário Ronei Mamoni pelas concessões quando foram necessárias e pelo auxílio na realização de todas as análises imunológicas.

À Andrea e Elimar do Departamento de Bioestatística da Faculdade de Ciências Médicas, pela realização da parte estatística do trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, José Fernando, Patrícia, Laudicéia, Eliana, Bárbara, Adriana, Juliana e Gisélia pela amizade e pelo auxílio didático e técnico .

À todos os amigos e colegas do Hospital Mario Gatti, em especial à Hilda, Maria do Socorro, Dilma, Kelly, Rúbia, Dayse, Rita e Gicélio, pelo seu incentivo e compreensão da importância desse trabalho.

À Cesar pelo carinho, apoio e pela compreensão da minha ausência.

À FAPESP (n 04/08733-8) pelo apoio financeiro.

À todos os que direta ou indiretamente compartilharam comigo seus conhecimentos e experiências para a realização desse trabalho.

*“É melhor atirar-se em luta,
em busca de dias melhores,
do que permanecer estático
como os pobres de espírito,
que não lutaram,
mas também não venceram. ”*

Bob Marley-

cantor jamaicano

que morreu de câncer em 1981

	<i>PÁG.</i>
RESUMO	xxx
ABSTRACT	xxxv
1- INTRODUÇÃO	39
1.1- Anemia	41
1.1.1- Anemia e câncer.....	42
1.1.2- Prevalência.....	42
1.1.3- Causas da anemia.....	42
1.1.4- Sinais e sintomas gerais.....	43
1.2- Anemia induzida pelo tratamento	43
1.3- Anemia, grau de oxigenação tumoral e resposta terapêutica	44
1.4- Anemia e qualidade de vida	45
1.5- Anemia da doença crônica	46
1.5.1- Citocinas envolvidas.....	49
Fator de necrose tumoral (TNF).....	49
Interferon gama (IFN- γ).....	50
IL-1.....	52
IL-6.....	53
Óxido Nítrico (NO).....	53
Neopterina (Neop).....	55
Hepcidina.....	56
Proteína creatina (PCR).....	61

1.5.2- Fisiopatologia da ADC.....	62
1.5.3- Características laboratoriais da ADC.....	66
1.6- Diferenciação entre ADC e Anemia Ferropriva.....	66
2- OBJETIVOS.....	69
3- CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	73
3.1- Local do estudo e procedência dos pacientes.....	75
3.2- Critérios de inclusão de pacientes no estudo.....	75
3.3- Critérios de exclusão de pacientes no estudo.....	75
3.4- Casuística e métodos.....	75
3.5- Análises realizadas.....	76
3.5.1- Avaliação da eritropoiese.....	76
3.5.2- Avaliação do metabolismo do ferro.....	77
3.5.3- Avaliação de parâmetros envolvidos na resposta inflamatória.....	78
3.6- Classificação do tipo de anemia.....	80
3.7- Análise estatística.....	81
4- RESULTADOS.....	83
4.1- Descrição da população.....	85
4.2- Avaliação do tipo de anemia.....	85
4.2.1- Descrição dos grupos de acordo com o tipo de anemia.....	86
4.3- Avaliação laboratorial.....	87
4.3.1- Avaliação hematológica e do estado do ferro.....	87
4.3.2- Avaliação da atividade inflamatória.....	93

4.4- Correlação entre atividade inflamatória e anemia.....	98
4.4.1- Correlação entre atividade inflamatória e o metabolismo do ferro.....	98
4.4.2- Correlação entre os níveis de hemoglobina e eritropoetina.....	100
4.4.3- Correlação entre os níveis de Hemoglobina e Eritropoetina.....	101
4.5- Avaliação dos parâmetros laboratoriais na diferenciação entre ADC e AF em pacientes com câncer.....	103
5- DISCUSSÃO.....	107
6- CONCLUSÃO.....	119
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	123
8- ANEXOS.....	145

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARC	Anemia Relacionada ao Câncer
ADC	Anemia de doença Crônica
AF	Anemia Ferropriva
CAISM	Centro de Atenção Integrada a Saúde da Mulher
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular média
DMT1	Proteína transportadora de metal divalente 1 (do inglês “Divalent metal transporter 1”)
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético (do inglês “ethylenediaminetetraacetic acid”)
EPO	Eritropoetina
Fe	Ferro
Fe ²⁺	Ferro na forma ferrosa
Fe ³⁺	Ferro na forma férrica
FTNA	Ferritina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (do inglês “Granulocyte macrophage colony-stimulating factor”)
Hb	Hemoglobina
HCM	Hemoglobina Corpuscular média
HFE-TfR	gene HFE transferrina
HPLC	Cromatografia Líquida de alta resolução (do inglês “High Performance Liquid Chromatography”)
HT	Hematócrito
IL	Interleucina

IL- β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IST	Índice de Saturação da Transferrina
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês “messenger ribonucleic acid”)
Neop	Neopterina
NO	Óxido Nítrico
NK	Células Natural Killer
NRBC	Contagem de eritroblastos (do inglês “Nucleated red blood cells”)
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>p</i>	coeficiente de Pearson
PCR	Proteína C Reativa
pH	Potencial hidrogeniônico
PLT	Contagem de Plaquetas
Pró-Hep	Pró-Hepcidina
Q	Quimioterapia
R	Radioterapia
R+Q	Radioterapia e Quimioterapia associadas
RBC	Contagem de eritrócitos (do inglês “Red Blood Count”)
RDW	Varição do diâmetro dos eritrócitos (do inglês “Red Cell Distribution Width”)
Ret	Contagem de reticulócitos
RET-Y	Valor médio do espalhamento da luz na população de reticulócitos
SA	Sem anemia
ST	Sem Tratamento

sTfR	Receptor solúvel da Transferrina (do inglês “Soluble Transferrin Receptor”)
sTfR/log FTNA	Receptor solúvel da Transferrina dividido pelo logaritmo da Ferritina
TfRs	Receptores de transferrina
TIBC	Capacidade Total de Ligação do ferro (do inglês “Total Bound Iron Capacity”)
TNF	Fator de Necrose Tumoral (do inglês “Tumoral Necrose Factor”)
TNF α	Fator de Necrose tumoral alfa
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas.
VCM	Volume Corpuscular Médio
VHS	Velocidade de Hemossedimentação
WBC	Contagem de Leucócitos (do inglês “White Blood Count”)

LISTA DE UNIDADES E GRANDEZAS

%	porcentagem
dL	decilitro
fL	fentolitro
g	grama
h	horas
IU	unidades internacionais
KDA	kilodalton
L	litro
m	mili
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetro
ng	nanograma
nmol	nanomol
pg	picograma
ug	micrograma
uL	microlitro

	<i>PÁG.</i>
Tabela 1- Valores de referência (recomendados pelos fabricantes).....	79
Tabela 2- Distribuição dos tipos de cânceres de acordo com a localização.....	85
Tabela 3- Frequência dos tipos de anemia em pacientes com câncer.....	86
Tabela 4- Distribuição por localização dos cânceres nos diversos grupos de pacientes.....	86
Tabela 5- Frequência dos diversos tipos de terapêutica nos grupos com e sem anemia.....	87
Tabela 6- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do ferro nos três tipos de anemia e no subgrupo de pacientes com câncer sem anemia. Valores em mediana (mínimo e máximo)...	89
Tabela 7- Parâmetros de marcadores inflamatórios nos três tipos de anemia e no subgrupo de pacientes com câncer sem anemia. Valores em mediana (mínimo-máximo).....	95
Tabela 8- Coeficiente de correlação (Spearman) entre as variáveis relacionadas com a anemia e com a atividade inflamatória nos diversos grupos estudados.....	99
Tabela 9- Coeficiente de correlação (Spearman) entre as variáveis relacionadas com a atividade inflamatória e o metabolismo do ferro.....	101

		PÁG.
Figura 1-	Estrutura Química da Hepsidina.....	57
Figura 2-	A Hepsidina regulando a expressão de ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos.....	60
Figura 3-	Fisiopatologia da anemia associada ao câncer.....	63
Figura 4-	Boxplots referentes à Hb em todos os grupos estudados.....	90
Figura 5-	Boxplots referentes ao VCM em todos os grupos estudados.....	90
Figura 6-	Boxplots referentes ao RET-Y em todos os grupos estudados.....	91
Figura 7-	Boxplots referentes ao sTfR em todos os grupos estudados.....	92
Figura 8-	Boxplots referentes ao sTfR/log FTNA em todos os grupos estudados.....	92
Figura 9-	Boxplots referentes à EPO em todos os grupos estudados.....	93
Figura 10-	Boxplots referentes à PCR em todos os grupos estudados.....	96
Figura 11-	Boxplots referentes à IL-6 em todos os grupos estudados.....	96
Figura 12-	Boxplots referentes à IL-1 beta em todos os grupos estudados.....	97
Figura 13-	Boxplots referentes ao VHS em todos os grupos estudados.....	97
Figura 14-	Correlação entre níveis de Hb e log EPO nos vários grupos estudados.....	102
Figura 15-	Curva ROC para sTfR/log FTNA (ADC e AF).....	103
Figura 16-	Curva ROC para TIBC (ADC e AF).....	104
Figura 17-	Curva ROC para PCR (ADC e AF).....	104
Figura 18-	Protocolo proposto para diferenciação entre ADC,ARC e AF em pacientes com câncer.....	105

RESUMO



Os pacientes com câncer podem apresentar diversas anormalidades hematológicas, sendo a anemia a alteração mais comum. A etiologia da anemia é multifatorial, envolvendo mecanismos que podem estar relacionados ou não à doença (perda de sangue, hemólise, infiltração medular), ao tipo e estágio do tumor e também à terapêutica utilizada (radioterapia e quimioterapia). A redução nas taxas de hemoglobina pode estar relacionada a alterações na produção e na resposta dos precursores eritróides à Eritropoetina, à liberação de citocinas nas diversas fases da doença e também ao déficit nutricional muitas vezes encontrado nesses indivíduos. O objetivo desse estudo foi avaliar aspectos relacionados à atividade inflamatória sobre o metabolismo do ferro e a eritropoiese em pacientes com tumores sólidos. Foram coletadas amostras de sangue de 402 pacientes adultos com diversos tipos de câncer. Os pacientes com anemia foram sub-classificados como tendo anemia ferropriva (AF) (hipoferremia e hipoferritinemia), Anemia de Doença Crônica (ADC) (hipoferremia e ferritina sérica normal ou aumentada) e Anemia Relacionada ao Câncer (ARC) (sem anormalidades no metabolismo do ferro). Para a avaliação da eritropoiese foram realizados hemograma completo e dosagem de eritropoetina; para a avaliação do metabolismo do ferro: determinações do ferro sérico, capacidade de ligação do ferro à transferrina, ferritina e receptores solúveis da transferrina (sTfR) e Índice sTfR/ log ferritina; para a avaliação da resposta inflamatória: dosagens de Proteína C Reativa (PCR), Interleucinas 1 β e 6, Fator de Necrose Tumoral alfa, neopterinina e pro-hepcidina séricas e determinação da Velocidade de Hemossedimentação das hemáceas(VHS). Dentre os pacientes com câncer 34,8 % apresentaram anemia. O tipo de anemia mais freqüente foi a ARC (37%) seguido pela ADC (20,7%) e finalmente pela AF (17%). Os níveis de PCR, IL-6, VHS e IL-1 β foram significativamente superiores em pacientes com ADC quando comparados com AF, ARC ou em pacientes sem anemia. Os níveis de Pró-Hepcidina, TNF- α e neopterinina não foram diferentes entre os grupos de pacientes com câncer, mas foram superiores quando comparados a um grupo de indivíduos normais. O efeito negativo de fatores inflamatórios sobre a eritropoiese foi observado no grupo de pacientes com ADC, onde houve correlação inversa entre hemoglobina e ferritina sérica, PCR e IL-6. Não houve correlação entre os níveis de pro-hepcidina com o grau de anemia ou com parâmetros relacionados ao metabolismo de ferro. De acordo com nossos resultados, embora não tenha sido possível demonstrar uma relação direta entre inflamação

e alterações no metabolismo do ferro, a atividade inflamatória presente em todos os grupos de pacientes, aparentemente está especialmente relacionada à patogênese da ADC. A hepcidina é reconhecida como importante reguladora e como principal mediadora das alterações do metabolismo do ferro na ADC. No presente trabalho, usando um ensaio imunoenzimático comercial, não foi possível demonstrar o significado fisiológico da pro-hepcidina na anemia em pacientes com câncer.

ABSTRACT



Patients with cancer present several hematological alterations, and anemia is the most common of them. Anemia etiology is multifactorial and can be related or not to the disease (bleeding, hemolysis, bone marrow infiltration), to the type and stage of the tumor and also to the therapy. Hemoglobin reduction can be consequent to alteration in production and response of erythroid precursor to erythropoietin, releasing of cytokines and nutritional deficiency. The objective of this study was to evaluate some aspects related to inflammatory activity on iron metabolism and erythropoiesis in patients with solid tumors. Blood samples from 402 patients were analyzed and those patients with anemia were subdivided into: iron deficient anemia (IDA) (hypoferremia and hypoferritinemia), chronic disease anemia (CDA) (hypoferremia and serum ferritin normal or elevated) and anemia related to cancer (ARC) (no iron abnormalities). Erythropoiesis was assessed by complete blood cell count and erythropoietin determinations; iron metabolism by serum iron, total iron binding capacity, serum ferritin, soluble transferrin receptors (sTfR) and sTfR/log ferritin indices; inflammatory response by C-Reactive protein (CRP), interleukins 1 β e 6, tumor necrosis factor α (TNF- α), neopterin, pro-hepcidin and erythrocyte sedimentation rate (ESR). Anemia was observed in 34.8% of cancer patients. The majority of patients presented ARC (37%), followed by CDA (20.7%) and IDA (17%). CRP, IL-6, ESR and IL-1 β levels were significantly higher in patients with CDA than in IDA, ARC and cancer without anemia. Pro-hepcidin, TNF- α and neopterin values were not different among anemic patients groups, although higher levels of neopterin had been observed in patients with cancer when compared to normal individuals. The negative effect of inflammatory factors on erythropoiesis represented by inverse correlations between hemoglobin and serum ferritin, CRP and IL-6 were observed in ADC group. There was correlation neither between pro-hepcidin levels and anemia degree nor between pro-hepcidin and iron metabolism parameters. According to our results, although it was not possible to demonstrate a direct correlation between inflammation and iron metabolism alterations, the inflammatory activity apparently is related to ADC pathogenesis. Hpcidin is an important regulator of iron metabolism and has been recognized as the main mediator of iron metabolism alterations in CDA. In our study, by using ELISA test, it was not possible to show the participation of pro-hepcidin in anemia in cancer patients.

1- INTRODUÇÃO

1.1- Anemia

A anemia ocorre quando o equilíbrio entre a produção e a destruição de eritrócitos é afetado, tornando a capacidade de transporte de oxigênio no sangue periférico insuficiente para suprir as necessidades dos diversos tecidos. De maneira geral a anemia pode ser conseqüente à:

- Produção inadequada dos eritrócitos
- Redução da sobrevivência dos eritrócitos na circulação devido à hemólise ou perda sangüínea
- Retenção exagerada de eritrócitos essencialmente normais em um baço anormalmente grande
- Seqüestro de eritrócitos anormais como acontece, por exemplo, na anemia falciforme (Bain, 1997),

A redução da concentração de hemoglobina nos eritrócitos é o principal parâmetro laboratorial para diagnosticar a anemia. O valor normal de hemoglobina para adultos é de 13-17 g/dL em homens e de 12-15 g/dl em mulheres. (Bain, 1997),

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos a anemia pode ser classificada clinicamente como:

- Anemia leve: a queda na concentração de hemoglobina não causa sintomas (o nível varia de indivíduo para indivíduo).
- Anemia moderada: a queda na concentração de hemoglobina provoca sintomas, mas ainda não há necessidade de transfusões.
- Anemia grave: a baixa concentração de hemoglobina geralmente resulta na necessidade de transfusão de eritrócitos (geralmente quando o nível de hemoglobina situa-se abaixo de 8,0 g/dl) (Groopman et al, 1999).

1.1.1- Anemia e câncer

1.1.2- Prevalência

Pacientes com câncer podem apresentar diversas alterações hematológicas. Cerca de 50% dos pacientes apresentam anemia, o que representa a maior causa de morbidade nessa população (Bron et al, 2001). A anemia é mais freqüente em pacientes com câncer hematológicos do que com tumores sólidos e sua freqüência aumenta à medida que a doença se torna mais grave (Skillings,1993).

Um estudo epidemiológico conduzido no Canadá em que indivíduos com vários tipos de câncer foram estudados mostrou que 28% dos pacientes tornaram-se anêmicos em algum estágio da doença e 12% desses pacientes necessitaram de transfusão (Skillings et al, 1999). Na França um estudo com 1064 pacientes em quimioterapia (sem derivados de platina) para tratamento de câncer da região coloretal, de mama, de pulmão e ovário revelou que 37% dos pacientes apresentaram anemia (Coiffier et al, 2001). A prevalência foi relativamente baixa em pacientes com câncer coloretal e mama que recebem tratamento quimioterápico (10 a 20%), mas relativamente alta em pacientes recebendo tratamento quimioterápico para linfoma não Hodgkin, câncer de ovário e pulmão (50 a 60%) (Skillings et al, 1995). Mais recentemente, em um levantamento feito na Europa com 15.367 pacientes com câncer, foi relatado que 67% deles tiveram anemia e que mais de 60% não receberam nenhum tratamento específico (Harper e Littlewood, 2005).

A prevalência e a gravidade da anemia associada ao câncer estão relacionadas com a agressividade, tipo e estágio do tumor, assim como com o tempo e a intensidade do tratamento (Obermair et al, 1998).

1.1.3- Causas da anemia

São apontadas como possíveis causas da anemia associadas ao câncer: perda sangüínea, excesso de destruição dos eritrócitos, ação mielossupressora e nefrotoxicidade de agentes radio e quimioterápicos, infiltração e fibrose medular pelo tumor, inadequada produção de eritropoetina (EPO), deficiências nutricionais (ferro, folato, vitamina B12),

diminuição ou utilização ineficiente do ferro e infecções intercorrentes (Ludwig et al, 1998; Faquin et al,1992; Means,2003).

Os pacientes com câncer comumente apresentam processo inflamatório crônico associado. Esse processo causa diversas alterações fisiológicas (anorexia, náusea, vômitos e desordens no metabolismo) que podem levar à caquexia e provavelmente à anemia. (Macció et al,2005).

Algumas causas da anemia estão associadas a particularidades do tumor. Por exemplo, pacientes com tumores gastrointestinais, urinários e uterinos frequentemente apresentam hemorragias. Leucemias linfóides crônicas e linfomas estão associados com anemias hemolíticas autoimunes e infiltração da medula óssea. Contudo, ocorrem casos onde não há infiltração na medula óssea, perda sangüínea, hemólise, ou outras desordens nutricionais, hepáticas ou renais que possam explicar a anemia (Moldawer, 1989).

1.1.4- Sinais e sintomas gerais

Os principais sintomas de anemia nos pacientes com câncer são comuns a diversos tipos de anemia: fadiga, vertigens, depressão, anorexia, náuseas, síndrome dispéptica, alterações do sono, alterações menstruais e perda da libido.

Entre os sinais apresentados por esses pacientes podemos destacar a dispnéia, complicações cardiovasculares, alteração de funções cognitivas, diminuição da temperatura da pele e palidez da pele e das mucosas. A gravidade desses sintomas depende não só do grau de anemia, mas também da doença de base (tipo de câncer) e da capacidade cardiovascular e pulmonar do paciente (Ludwig e Fritz, 1998).

1.2- Anemia induzida pelo tratamento

O tipo e a intensidade do tratamento tem um considerável impacto nos níveis de hemoglobina (Skillings et al, 1995). A radioterapia pode induzir ou agravar a anemia.

Dependendo da dose e do local, a radiação pode causar um dano prolongado ao “pool” de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea (Mughal, 2001). A quimioterapia citotóxica não se restringe às células malignas, mas afeta qualquer célula com capacidade proliferativa. Os mecanismos indutores de anemia variam de acordo com o tipo de droga e incluem: morte da célula progenitora, bloqueio ou atraso na produção de fatores hematopoiéticos, dano oxidativo às células maduras e destruição celular mediada pelo sistema imune (Bokemeyer, 2001). Em particular, a nova geração de taxanos, agentes quimioterápicos com ação antimicrotubular e que são mielossuppressores podem contribuir para o agravamento da anemia em pacientes com câncer (Bron et al,2001).

Determinados quimioterápicos como a cisplatina, paclitaxel, docetaxel, vinorelbina, topotecam, irinotecam, etoposide e ifosfamida estão mais frequentemente associados com a anemia grave (Barret-Lee et al, 2000).

A anemia em pacientes com câncer tem sido considerada como de mau prognóstico da doença (Cabanillas et al,1978; Moullet et al,1998). Além disso a anemia pode diminuir a resposta do tumor à radioterapia (Hirst,1986; Smaniotto et al, 2000) e à radio e quimioterapia associados (Thews et al,1998; Shasha, 2001).

Tumores sólidos como câncer de pulmão e ovário, que são tratados com derivados de platina, são considerados como os que requisitam maior número de transfusões sanguíneas. Drogas derivadas de platina são conhecidas por causarem toxicidade renal e, com isso, afetarem a produção de Eritropoetina (EPO) (Clarke e Palister, 2005).

1.3- Anemia, grau de oxigenação tumoral e resposta terapêutica

Pacientes cujos tumores apresentam altos níveis de hipóxia têm menor controle da doença e menores chances de cura quando comparados com pacientes com melhor oxigenação tumoral no mesmo estágio e tamanho do tumor (Brizel et al, 1996). A hipóxia tumoral depende de fatores como: tamanho do tumor, tipo e estágio histológico, aporte de hemoglobina e extensão da necrose. A hipóxia tumoral ocorre quando o tamanho do tumor

excede a capacidade da microcirculação em suprir oxigênio para as células tumorais. Vários estudos mostram que o grau de hipóxia é maior na área tumoral do que nos tecidos adjacentes normais (Clarke e Pallister, 2005; Kelleher et al ,1996).

A relação entre hipóxia tumoral e evolução ou gravidade do processo neoplásico pode ser explicada por 3 hipóteses: primeiro, a hipóxia pode induzir a mudanças na expressão das proteínas oxigênio-dependentes do tumor como o fator de crescimento endotelial, estimulando a angiogênese e dessa forma aumentando o potencial de crescimento de tumores e metástases. Segundo, a hipóxia impede a formação de moléculas de oxigênio reativas que quando submetidas à radioterapia causam danos no DNA das células tumorais. Assim, a redução dos níveis de oxigênio contribuiriam para a resistência à radioterapia.. Terceiro, a hipóxia pode produzir um crescimento acelerado de células tumorais que são resistentes à apoptose, dificultando o processo de cura e o controle da doença (revisado em Clarke e Pallister 2005). Além disso, a hipóxia tumoral pode aumentar a expressão do gene supressor tumoral p53, um fenótipo celular que apresenta um maior potencial de tornar-se maligno (Littlewood, 2001).

Vários trabalhos mostraram que a correção da anemia pode melhorar a -resposta à quimio e à radiosensibilidade do tumor (Teicher ,1994, Silver e Piver,1999, Thews et al. 2001). Obermair (2001) estudando pacientes com câncer cervical relatou que a resposta à quimioterapia é 90% mais eficiente quando os níveis de hemoglobina estão acima de 11g/dL durante qualquer ciclo da quimioterapia, sugerindo que a concentração de hemoglobina circulante estaria relacionada com o grau de oxigenação do tumor e, conseqüentemente, com a resposta à quimioterapia.

Esses dados sustentam a importância da monitorização dos níveis de hemoglobina nos pacientes, o que pode representar um maior sucesso na terapia antineoplásica (Vaupel, 1994).

1.4- Anemia e qualidade de vida

A qualidade de vida é avaliada por meio de quatro parâmetros básicos: bem-estar físico, que representa o atual estado físico, incluindo a doença e os efeitos colaterais do tratamento; bem-estar funcional, que se refere à habilidade da pessoa

desempenhar atividades básicas cotidianas; bem-estar mental ou emocional, que se refere não só à angústia emocional, mas também à atitudes positivas ou alegria de viver; e bem-estar social, que envolve atividades com o apoio da família e amigos (Cella,1997).

Além de todas as repercussões físicas e emocionais oriundas do próprio câncer, há de se considerar que a intensidade do tratamento e sua toxicidade também podem contribuir para uma piora na qualidade de vida dos pacientes com câncer (Cella,1997).

Nesse sentido, a manutenção de níveis adequados de hemoglobina é importante, já que sintomas relacionados à anemia como fadiga, letargia, dispnéia, perda de apetite e dificuldade de concentração, adicionados a outros problemas emocionais e físicos contribuem negativamente para a qualidade de vida desses pacientes. (Winningham, 1994, Harper e Littlewood 2005).

Fica assim evidente a importância de se diagnosticar a anemia, definir sua etiologia e, se possível, aplicar o tratamento adequado. Entretanto, nem sempre é possível se definir o tipo de anemia que o paciente apresenta. Muitos pacientes não apresentam alterações como perda sanguínea, disfunção renal ou hepática, infiltração da medula, hemólise ou deficiências nutricionais que poderiam explicar a anemia e a ferropenia e são diagnosticados como tendo anemia de doença crônica (ADC), assunto abordado nesse estudo e que será apresentado a seguir.

1.5- Anemia da doença crônica

A observação que a infecção estava associada com hipoferremia foi feita em 1932 por Locke et al, o que possibilitou uma explicação parcial para a anemia presente em pacientes com infecções crônicas.

Em 1952, Cartwright e Wintrobe demonstraram que a anemia associada com infecções era indistinguível da anemia de inflamação, e sugeriram que a hipoferremia seria o resultado do seqüestro de ferro pelo sistema reticuloendotelial e da interrupção da absorção do ferro intestinal. Observações semelhantes foram encontrados em ratos submetidos à exposição a endotoxinas bacterianas (Cartwright ,1971).

Atualmente é sabido que a ADC tem sua fisiopatogênese associada a dois fatores principais: alterações na proliferação e diferenciação da série eritróide e distúrbios no metabolismo do ferro resultando em um déficit na síntese de hemoglobina. Assim, a ADC é definida como uma anemia hipoproliferativa caracterizada pela baixa concentração de ferro no plasma ou soro, embora os estoques de ferro no sistema reticuloendotelial apresentem-se adequados (Means, 2003).

Para melhor entender as alterações no metabolismo do ferro na ADC, seria interessante rever, brevemente, como acontece esse metabolismo em condições normais, que pode ser assim resumidamente apresentado:

A homeostase do ferro é mantida basicamente por meio de dois mecanismos: regulação da absorção do ferro da dieta no intestino e a reciclagem do ferro proveniente da destruição de hemácias senescentes. O ferro originário da reciclagem das hemácias é produto da degradação da molécula de hemoglobina que ocorre nos macrófagos do baço após a média de 120 dias de sobrevivência das hemácias e representa a principal fonte de ferro para o organismo (Hoffbrand e Pettit, 1995; Wintrobe et al, 1998).

A absorção do ferro ocorre no duodeno e jejuno. Mais de 90% do ferro da dieta é absorvido como sais de ferro presentes nos vegetais e laticínios e os 10% restantes na forma heme. Os sais de ferro são solubilizados pelo suco gástrico e, então, absorvidos. Como só a forma ferrosa do ferro é passível de absorção, uma redutase férrica localizada na superfície apical da célula da mucosa é responsável pela transformação do ferro $+++$ em ferro $++$. O ferro $++$ é então internalizado por meio da ligação com uma proteína transportadora chamada DMT-1 (proteína transportadora de metal divalente 1). A absorção do ferro nas formas de mioglobina e hemoglobina provenientes da ingestão de carnes é feita por um mecanismo aparentemente mais simples e mais eficiente do que a absorção dos sais de ferro. O ferro heme é absorvido como uma metaloporfirina intacta e, no interior da célula, é liberado da porfirina pela heme oxigenase, entrando na circulação como ferro inorgânico. (Hoffbrand e Pettit, 1995; Wintrobe et al, 1998).

No interior da célula o ferro é estocado na forma de ferritina ou é conduzido para a superfície basolateral celular dos enterócitos, onde será oxidado por meio da ação da hefaestina e finalmente exportado pela ferroportina. A ferroportina também é responsável

pela exportação do ferro nos macrófagos e a enzima oxidante no plasma equivalente a hefaestina no intestino é a ceruloplasmina (Weinstein et al 2002, Chung e Wessling-Resnick 2003).

No plasma a transferrina tem alta afinidade pelo ferro na forma férrica e transportará o ferro para os locais de depósito ou para os órgãos que requerem o ferro para o seu metabolismo. O complexo transferrina-ferro é internalizado nas células por meio da ligação com o receptor de transferrina (TfR) (Conrad et al, 1999).

O TfR está presente em praticamente todas as células do organismo, mas principalmente nos precursores eritróides, células da placenta e fígado. Trata-se de uma glicoproteína de aproximadamente 9500 Daltons, composta de dois monômeros ligados por pontes dissulfeto, que possui um domínio citoplasmático de 61 aminoácidos, um segmento transmembrana de 28 aminoácidos e um segmento extracelular com 671 resíduos. Cada receptor liga-se a uma ou duas moléculas de transferrina que, após a invaginação da membrana e formação de vesícula endocítica acidificada promove a liberação do ferro. O complexo receptor-transferrina é reciclado de volta à superfície das células, enquanto o ferro liberado no citoplasma é utilizado ou estocado (Seligman, 1983). A clivagem proteolítica da porção extracelular do TfR dentro das vesículas endocíticas ou exocíticas, dá origem à forma solúvel do TfR (sTfR), presente no soro complexado à molécula de Tf. As concentrações séricas do receptor estão correlacionadas com o conteúdo total de receptores localizados na superfície celular (Skikne,1998). Considerando que o TfR é derivado principalmente de precursores eritróides na medula óssea e dos reticulócitos, o nível do sTfR reflete o nível da eritropoiese medular. A expressão de TfR na superfície celular está elevada quando há necessidade de maior captação de ferro, como nos casos de anemia ferropriva. Portanto, o nível de TfR apresenta uma relação direta com a atividade eritróide e uma função inversa com a disponibilidade celular de ferro (Béguin, 1992). Concentrações diminuídas de sTfR são observadas nas situações de decréscimo da eritropoiese, como na anemia aplástica e anemia secundária à quimioterapia ou insuficiência renal crônica, enquanto valores elevados são descritos quando há expansão da eritropoiese como nas anemias hemolíticas (Ferguson et al,1992).

Na anemia que acompanha processos inflamatórios o número de receptores não é alterado, o que torna a determinação do sTfR um método útil para distinguir ADC de Anemia Ferropriva (AF), diagnóstico diferencial por vezes difícil de ser feito (Ferguson et al,1992; Abshire, 1996).

1.5.1- Citocinas envolvidas

A participação do processo inflamatório e da rede de citocinas e seus produtos é fundamental na patogênese da anemia em pacientes com câncer. As que foram motivo do presente estudo ou que estão mais intimamente relacionadas com os aspectos da eritropoiese e metabolismo do ferro investigadas, são aqui resumidamente apresentadas:

Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O TNF é sintetizado nos fagócitos mononucleares, células T estimuladas por antígenos, células Natural Killer (NK) e mastócitos ativados como uma proteína transmembrana não glicosilada, com uma extremidade aminoterminal intracelular e uma grande extremidade carboxiterminal extracelular. O TNF de membrana é expresso como uma molécula com três partes idênticas formando um homotrímero. A forma de membrana do TNF é clivada por uma metaloproteinase e libera um polipeptídeo de 17 kDa. Três dessas cadeias polipeptídicas se polimerizam para formar a proteína circulante do TNF que possui 51 kDa. O TNF secretado assume uma forma de pirâmide que tem na sua base os sítios de ligação o que permite a ligação simultânea da citocina com três moléculas do receptor (Abbas & Lichtman, 2005).

As principais ações do TNF- α na resposta imune são:

- Aumenta a expressão das moléculas de adesão nas células endoteliais, aumentando o número de leucócitos na lesão.
- Estimula os macrófagos e outros tipos de células a secretarem citocinas que contribuem para o recrutamento de leucócitos.

- Ativa os leucócitos para a destruição de microorganismos.
- Participa na recuperação tecidual, durante o processo de angiogênese.
- Induz células tumorais à apoptose.
- Atua nas células reguladoras do hipotálamo induzindo à febre, junto com a IL-1
- Estimula a secreção de IL-1 e IL-6 pelos macrófagos.
- Atua nos hepatócitos aumentando a síntese de certas proteínas séricas como a proteína amilóide A
- Ativa o sistema de coagulação alterando o equilíbrio entre as atividades pró-coagulantes e anticoagulantes do endotélio vascular (Abbas et al,1997).

O TNF- α interfere na hematopoiese tanto na proliferação celular como no metabolismo do ferro. Inibe a expressão e a resposta da medula à EPO (Schooley et al,1987; Johnson et al,1990; Ulich et al,1990;Clibon et al 1990; Means et al, 1990; Faquin et al, 1992; Jelkmann 1998), estimula a eritrofagocitose (Moldaver 1989) e intensifica a apoptose da CFU-E (Trey e Kushner, 1995, Bron et al, 2001). Suas ações sobre o metabolismo do ferro são bastante diversas. Por um lado aumenta a síntese de ferritina (Torti e Torti, 2002) e por outro interfere na exportação do ferro pelos macrófagos, já que diminui a expressão da ferroportina (Ludwiczek et al, 2003) e aumenta a expressão da DMT-1 e TfR2 dos macrófagos, hepatócitos e fibroblastos, aumentando a captação de ferro (Ludwiczek et al, 2003; Thomas e Thomas, 2005). O conjunto desses mecanismos leva a uma menor proliferação celular e à menor disponibilidade de ferro que permanece armazenado nas células do SRE.

Interferon gama (IFN- γ)

O IFN- γ é uma glicoproteína homodimérica, cuja atividade está relacionada à sua configuração em que as duas subunidades idênticas podem interagir com dois receptores levando à sua agregação e ativação. É derivado principalmente das células T ativadas (Th0 , TH1 e CD8+) e células Natural Killer (NK) (Abbas and Lichtman, 2005).

O IFN- γ apresenta diversas funções biológicas representadas em três atividades principais: atividade antiviral, atividade antitumoral e efeitos imunomoduladores. Embora tenha sido originalmente reconhecido como um agente antiviral, são suas atividades imunomoduladoras que possuem uma maior importância biológica, já que tem um papel importante na fase efetora da resposta imune mediada por células. É uma citocina pleiotrópica que influencia o crescimento, a diferenciação e a ativação das células T, células NK, macrófagos e células dendríticas, células efetoras essenciais no sistema imune inato (Takaoka e Yanai, 2006). O IFN- γ pode atuar juntamente com TNF- α e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio nos macrófagos (Male et al, 1996).

Na hematopoiese o IFN- γ pode ser considerado, entre as citocinas, como o mais potente inibidor da proliferação de CFU-E e BFU-E (Means, 2003). Esse efeito inibidor pode ser comprovado pela correlação inversa entre os níveis de IFN- γ e as concentrações de hemoglobina e contagem de reticulócitos no sangue periférico (Weiss, 2002). Exerce também um efeito apoptótico entre as CFU-E (Trey e Kushner, 1995; Kushner et al 1998; Bron et al, 2001).

Outra atividade inibitória do IFN- γ seria como interferente na resposta da medula à EPO. Acredita-se que essa atividade seja devido à sua ação na diminuição da expressão de receptores de EPO (Means, 1999).

Dentre as ações no metabolismo do ferro do IFN- γ podemos destacar:

- Estimula a transcrição mas inibe a tradução da síntese de ferritina, provavelmente por induzir a ligação IRP+IRE por meio da ação do Óxido Nítrico produzido pelo IFN- γ (Weiss et al, 1993, Weiss et al, 1997),
- Inibe a expressão do RNAm do TfR (Byrd e Horwitz 1993),
- Estimula a expressão da proteína DMT1 aumentando dessa forma a captação de ferro na forma ferrosa (Fahmy e Young, 1993),
- Induz a retenção de ferro nos enterócitos pela regulação negativa da ferroportina (Weiss et al, 1997).

IL-1

A IL-1 apresenta-se em duas formas: IL-1 α e IL-1 β , que são produzidas por dois tipos de genes diferentes. Ambas as formas são polipeptídeos de 17 kDa e apresentam menos de 30% de homologia entre eles. Ambas as formas ligam-se aos mesmos receptores de superfície celular e possuem as mesmas atividades biológicas (Abbas et al,1997).

A principal fonte de IL-1 são os fagócitos mononucleares ativados. A produção de IL-1 é induzida por produtos bacterianos, tais como lipopolissacárides e por outras citocinas, tais como o TNF. A IL-1 também é produzida por neutrófilos, células epiteliais e células endoteliais aumentando a expressão das moléculas de superfície que regulam a adesão dos leucócitos (Abbas e Lichtman , 2005)

A principal função da IL-1 é como mediadora da resposta inflamatória inata. O efeito biológico da IL-1, como do TNF- α , depende da quantidade de citocina liberada. Em baixas concentrações age como um mediador no local da inflamação, junto com os macrófagos e células endoteliais. Quando em grandes concentrações induz a síntese de proteínas de fase aguda pelo fígado e estimula o gasto metabólico (caquexia) (Abbas et al,1997)

O principal envolvimento da IL-1 na eritropoiese consiste na sua capacidade de suprimir o crescimento das BFU-E e CFU-E (Means 2003). Além disso, junto com o TNF, a IL-1 inibe a produção de EPO por um mecanismo independente do fator indutor de hipóxia. A afinidade de ligação dos indutores de transcrição da EPO estaria afetada devido à formação de radicais livres (Jelkmann, 1998). A sobrevivência dos eritrócitos também pode ser afetada pela IL-1 por meio da indução da apoptose, contribuindo para instalação da anemia (Means,1999).

A IL-1 aumenta a tradução do RNAm da ferritina (Torti e Torti,2002), aumenta a expressão da DMT-1 e TfR2 dos hepatócitos e TfR dos macrócitos, elevando a captação do ferro (Thomas e Thomas,2005). Foi proposto que esta ferritina armazenada pudesse agir como uma armadilha para que o ferro não se tornasse disponível para a eritropoiese (Rogers et al, 1994) .

IL-6

A IL-6 é uma citocina de aproximadamente 26 KDaa .A forma funcional da IL-6 é um homodímero, com cada subunidade formando um domínio com quatro α -hélices. (Abbas e Lichtman, 2005) . É sintetizada pelos macrófagos, células do endotélio vascular, fibroblastos e outras células em resposta a IL-1 e ao TNF. A IL-6 também pode ser produzida pela ativação de células T (Abbas e Lichtman, 2005).

A IL-6 é o mediador central da resposta de fase aguda e o determinante primário da produção de proteína C reativa. Nos hepatócitos estimula a síntese de várias proteínas plasmáticas que atuam na resposta da fase aguda e nos linfócitos B estimula a diferenciação e conseqüentemente a produção de anticorpos (Abbas et al, 1997).

Na eritropoiese a IL-6 atua como um cofator com outras citocinas participando na inibição do crescimento de células jovens hematopoiéticas (Abbas et al,1997). Aumenta a produção de EPO nos hepatócitos, mas inibe sua produção nos rins (Jelkmann ,1998) limitando dessa forma a produção de EPO que é inapropriadamente baixa para o grau de anemia nas infecções, inflamações e desordens neoplásicas (Spivak,1993).

Contribui para uma maior captação de ferro pelos macrófagos por meio do estímulo da expressão de CD 163 (receptor para o complexo haptoglobina-hemoglobina) (Graversen 2002). A IL-6 é o principal indutor da expressão de hepcidina, importante regulador do metabolismo do ferro (Nemeth ,2004a).

Óxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é uma molécula gasosa simples, formada a partir da transformação da L-arginina em citrulina, sob a ação da óxido nítrico sintase induzível (iNOS). A iNOS é uma enzima citosólica que está ausente nos macrófagos em repouso, mas pode ser induzida como resposta à lipopolissacárides e a outros produtos bacterianos, especialmente quando combinados com o IFN. O NO tem uma ampla gama de atividades. Nos macrófagos, funciona como uma potente substância microbicida (Abbas and Lichtman, 2005). Tem um efeito anti-inflamatório por meio da inibição da indução de VCM-1 e ELAM-1 (molécula de adesão leucócito-endotelial 1) por citocinas (De Caterina

et al, 1995). Durante a hemólise intravascular, o NO reage com a oxihemoglobina (NO scavenging), levando a depleção do NO e, conseqüentemente, a uma redução na geração da guanina cíclica monofosfato (cGMP). Como resultado, ocorrem alterações no tônus da musculatura lisa, ativação e agregação plaquetárias, promovendo a formação de trombos (Rother et al 2005).

O NO pode bloquear a eritropoiese diretamente pela inibição da proliferação de progenitores eritróides na medula óssea (Donovan et al, 2000). Uma parte desse efeito está relacionada com a interferência do NO na biossíntese do heme, por meio do do bloqueio na tradução do RNAm da aminolevulinato sintase, por um mecanismo que envolve a ativação das proteína reguladoras do ferro (IRP) e da redução da atividade da ferroquelatase, enzima responsável pela incorporação do ferro ao grupo pirrólico, passo final da via da biossíntese do heme (Weiss, 2002).

Em um experimento realizado com camundongos anêmicos infectados com Trypanossoma, Mabbott e Sternberg injetaram uma substância inibidora de NO e perceberam uma redução significativa da gravidade da anemia (Mabbot e Sternberg,1995).

Além dessas ações o NO participa também diminuindo a sobrevivência das hemáceas circulantes (Means,1999).

Um estudo realizado por Recalcati et al estimulando macrófagos com lipopolissacarides mostrou que o NO atua aumentando levemente os IRP-1 e reduzindo drasticamente os IRP2, levando dessa forma a um aumento na tradução da ferritina (Recalcati et al,1998). O NO participa também no aumento da tradução do RNAm do receptor de transferrina (Domachowske, 1997, Weiss et al, 1997).

A presença de acúmulo de ferro pode levar a diminuição da formação de óxido nítrico (NO) por meio do do bloqueio da transcrição da enzima iNOS (Weiss et al ,1993). A sobrecarga de ferro nos macrófagos leva a uma diminuição de NO e dessa forma os macrófagos perdem sua capacidade para destruir patógenos intracelulares, como Legionella , Listeria , Erlichia e Candida pelas vias mediadas pelo IFN- γ (Brock,1994; Weiss et al,1995; Menacci et al ,1997).

Neopterina (Neop)

A neopterina (2-amino-4-hidroxi-6-(D-eritro-1',2'3'-trihidroxiopropil)-pteridina) pertence à classe das pteridinas derivadas biosinteticamente da guanosina trifosfato (GTP) (Murr et al,2002). É sintetizada e secretada por monócitos e macrófagos ativados (Sheldon et al, 1991, Iwagaki et al,1995) e sua secreção é induzida pelo INF- γ (Romagnani, 1994; Lucey et al, 1996).

Estudos in vitro mostraram que a neopterina pode aumentar a liberação de TNF- α de monócitos estimulados por lipopolissacárides, sugerindo assim, uma habilidade da neopterina em modular o perfil de citocinas participantes da ativação imune (Barak e Gruener, 1991, Fuchs et al, 1992)

As concentrações de neopterina encontram-se aumentadas em uma grande variedade de condições nas quais o sistema imune mediado por células é ativado, como nos transplantes de medula óssea e outros órgãos, doenças como artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico, esclerose múltipla, sarcoidose, diabetes, insuficiência cardíaca congestiva e diversas doenças infecciosas (Reibnegger et al, 1986a; Sheldon et al, 1991; Fuchs et al,1992; Grotto et al,1994; Iwagaki et al, 1995a; Muller et al,1998b; Hamerlinck, 1999).

Em doenças neoplásicas, altas concentrações de neopterina no soro, urina ou líquido ascítico, indicaram um risco aumentado de recidiva do tumor, aparecimento de metástases ou morte do paciente (Fuchs et al 1992, Murr et al 1999b). Foram observadas concentrações elevadas de neopterina em pacientes com diferentes tipos de câncer, como: linfomas de Hodgkin e Não-Hodgkin, leucemia linfóide crônica e mieloma múltiplo (Hausen et al 1982), assim como em cânceres ginecológicos (Reibnegger et al 1986b, Reibnegger et al 1987), tumores genitourinários masculinos (Aulitzky et al 1985, Lewenhaupt et al 1986), câncer de pulmão (Fuchs et al 1992), e em carcinomas de células escamosas da cavidade oral (Murr et al,1998). Com exceção do câncer gastrointestinal, foi observada uma associação entre os níveis de neopterina e o grau de malignidade do tumor, assim como com o prognóstico. (Fuchs et al 1992, Putzki et al 1987). Em um grupo de pacientes com câncer de mama, somente 20% dos pacientes tinham níveis elevados de

neopterinina (Fuchs et al 1992). Adicionalmente, outro estudo mostrou uma correlação entre altas concentrações de neopterinina e a presença de metástases e até mesmo com o grau de diferenciação do tumor (Murr et al 1999a).

Em pacientes com ADC , a diminuição nos níveis de hemoglobina está associada com concentrações aumentadas de neopterinina. A correlação negativa entre neopterinina e hemoglobina pode ser explicada pela ação simultânea de citocinas , por exemplo, IFN- γ na sobrevivência dos eritrócitos, e neopterinina na eritropoiese. (Melichar et al, 2006). A neopterinina tem uma ação inibitória indireta na eritropoiese, por meio do bloqueio da transcrição do RNAm da EPO (Pagel et al,1999).

Níveis elevados de neopterinina sérica foram associados à distúrbios do metabolismo do ferro, como aumento da ferritina e diminuição do ferro sérico (Denz et al 1992, Fuchs et al 1993). Essas alterações podem ser conseqüentes à ação das pteridinas sobre a redução do ferro férrico a ferroso, facilitando dessa forma a transferência do ferro para as formas de depósito (Hausen et al, 1982).

Em um estudo com pacientes com câncer ginecológico foi relatada correlação negativa entre os níveis de neopterinina urinária e hemoglobina, hematócrito, ferro sérico, capacidade de ligação do ferro a transferrina, e índice de saturação da transferrina, enquanto uma correlação positiva foi observada entre neopterinina urinária e ferritina de soro e níveis de EPO. Estes resultados sugerem que a ativação do sistema imune levaria ao aumento dos níveis de neopterinina, que atuando no metabolismo do ferro contribuiria para a patogênese da anemia em pacientes com câncer ginecológico (Reibnegger et al,1986b).

Hepcidina

A hepcidina é um peptídeo sintetizado pelos hepatócitos. O nome HEP significa fígado e CIDIN significa antibacteriano. (Fleming 1998).

Sua estrutura química foi descrita por Hunter et al (2002) que, por meio do de técnicas de espectrofotometria e ressonância magnética, constataram tratar-se de uma molécula de estrutura retorcida em forma de grampo de cabelo cujos dois braços estão ligados por pontes dissulfeto em uma configuração de escada. Uma característica altamente

incomum da molécula é a ligação de pontes dissulfeto entre duas cisteínas adjacentes junto a sua curva mais acentuada, o que confere uma maior reatividade química a molécula (Figura 1). (Ganz, 2005).

Embora a forma predominante da hepcidina presente na urina tenha 25 aminoácidos (hepcidina-25), foram também encontradas hepcidinas com dois peptídeos curtos na extremidade aminoterminal, hepcidina-20 e hepcidina-22. Como outros peptídeos antimicrobianos, resíduos hidrofílicos carregados positivamente estão espacialmente separados dos hidrofóbicos, uma característica de peptídeos que destroem as membranas das bactérias (Ganz, 2005). Assim, possui propriedades antibacteriana e antifúngica, cuja expressão é exacerbada com a administração de lipopolissacárides, um clássico indutor de proteínas de fase aguda (Fleming, 1998).

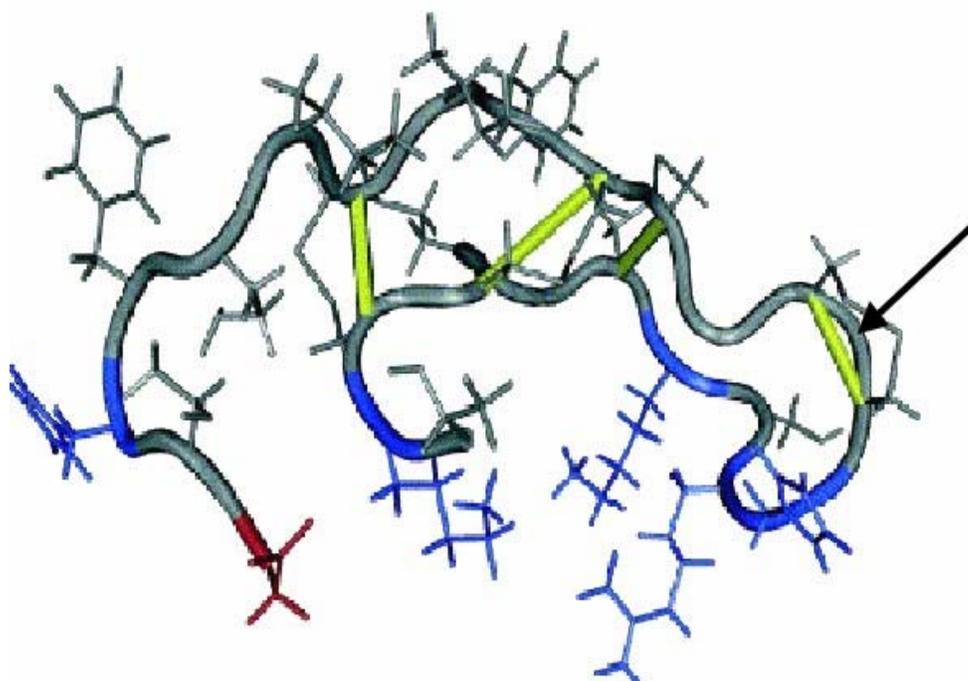


Figura 1- Estrutura Química da Hecidina.

Os resíduos carregados positivamente estão em azul, os negativos em vermelho e as pontes dissulfeto em amarelo. A seta indica a ponte dissulfeto entre duas cisteínas adjacentes. (Ganz e Nemeth, 2006 mod).

A hepcidina parece ter um efeito inibitório na eritropoiese sob 2 aspectos: o primeiro seria por meio da inibição da proliferação e diminuição da sobrevivência de progenitores eritróides, de acordo com estudo *in vitro* com células formadoras de colônia (Dallaglio et al, 2006). A segunda provável ação da hepcidina sobre a eritropoiese seria por meio da diminuição da resposta de células precursoras à EPO (Weinstein et al, 2002).

A relação entre hepcidina e metabolismo de ferro tem sido alvo de numerosos estudos. Pigeon et al (2001) e Nicolas et al (2002) propuseram ser a hepcidina um regulador negativo da captação do ferro no intestino e na liberação do ferro dos macrófagos. Assim, um aumento da captação do ferro pelo hepatócito pelo receptor de transferrina-2 (TfR-2) ou a exposição à lipopolissacárides levam ao aumento da produção e secreção da hepcidina que, por sua vez, interage com o complexo beta 2 microglobulina-HFE-TfR, aumentando a retenção de ferro nos macrófagos da cripta duodenal. Os enterócitos, em resposta ao acúmulo de ferro, expressam de forma reduzida as proteínas transportadoras, diminuindo a absorção do ferro da dieta (Fleming, 1998). Assim, a ação da hepcidina poderia explicar as alterações no metabolismo do ferro na ADC: menor concentração de ferro circulante e maior acúmulo de ferro no sistema reticuloendotelial.

Foi demonstrado que a inflamação pode levar a uma superprodução de hepcidina, predominantemente pela indução de hepcidina por meio de citocinas inflamatórias, especialmente a IL-6. A IL-6 participa nesse processo como uma citocina reguladora, que age diretamente nos hepatócitos estimulando a produção de hepcidina (Rivera et al 2005). Outras citocinas inflamatórias parecem não estimular a produção de hepcidina; como o TNF- α , que aparentemente impede que a produção de hepcidina ocorra (Andrews,2004).

Na investigação sobre a regulação da Hpcidina pela IL-6 Nemeth et al. (2004a) injetaram lipopolissacarídeos em ratos selvagens e em ratos nocauteados para o gene da IL-6. Os ratos selvagens aumentaram a expressão de hepcidina e mostraram uma diminuição significativa nos níveis de ferro sérico. Em contraste, nos ratos nocauteados para IL-6 não houve nenhum aumento na expressão de hepcidina e nem diminuição de ferro sérico. Uma experiência complementar realizada em voluntários humanos mostrou que a infusão de IL-6 estimulou a excreção de hepcidina urinária dentro de 2 horas e

induziu à hipoferremia (Nemeth et al, 2004a). Considerando esses dados, os autores sugeriram ser a IL-6 o indutor primário da expressão de hepcidina, e a aumentada expressão de hepcidina, por sua vez, resultaria em hipoferremia. Estes dados são consistentes com observações clínicas que mostram que a hipoferremia acontece logo após o início da inflamação (Andrews,2004).

A sobrecarga de ferro também pode atuar como um regulador da expressão de hepcidina, aumentando sua expressão e, assim, presumivelmente tentando compensar o excesso de ferro (Pigeon et al 2001, Muckenthaler, 2003).

A anemia e a hipoxemia participam como reguladores negativos da hepcidina, ou seja, níveis reduzidos de hemoglobina estariam associados a níveis reduzidos de hepcidina, favorecendo, assim, a absorção de ferro pelos enterócitos e a liberação do ferro dos estoques nos macrófagos (Ganz, 2003).

Recentemente foi proposto o mecanismo de ação da hepcidina no enterócito (Nemeth, 2004b) (Figura 2): a hepcidina regula a absorção do ferro pelo enterócito por meio da ligação com a ferroportina que é degradada, impedindo dessa forma que o ferro seja exportado para o plasma para ser transportado pela transferrina. Quando os estoques de ferro estão altos, o fígado produz hepcidina que degrada a ferroportina e bloqueia a transferência de ferro dos enterócitos para o plasma. O acúmulo de ferro nos enterócitos leva à menor expressão da DMT-1 da membrana luminal do enterócito, diminuindo assim a absorção do ferro. Quando os estoques de ferro estão baixos, a produção de hepcidina é suprimida, e a absorção é preservada. A interação hepcidina-ferroportina também explica o acúmulo de ferro em macrófagos em doenças inflamatórias caracterizadas pela alta produção de hepcidina. Na presença de hepcidina, a ferroportina é interiorizada, a exportação do ferro é bloqueada, e o ferro fica armazenado dentro dos macrófagos. A interação direta da hepcidina com a ferroportina não é necessariamente a única via pelo qual a exportação do ferro é regulada. Há evidências que os níveis de mRNA da ferroportina também são regulados pelos níveis de ferro (McKie et al, 2000; Frazer et al, 2002).

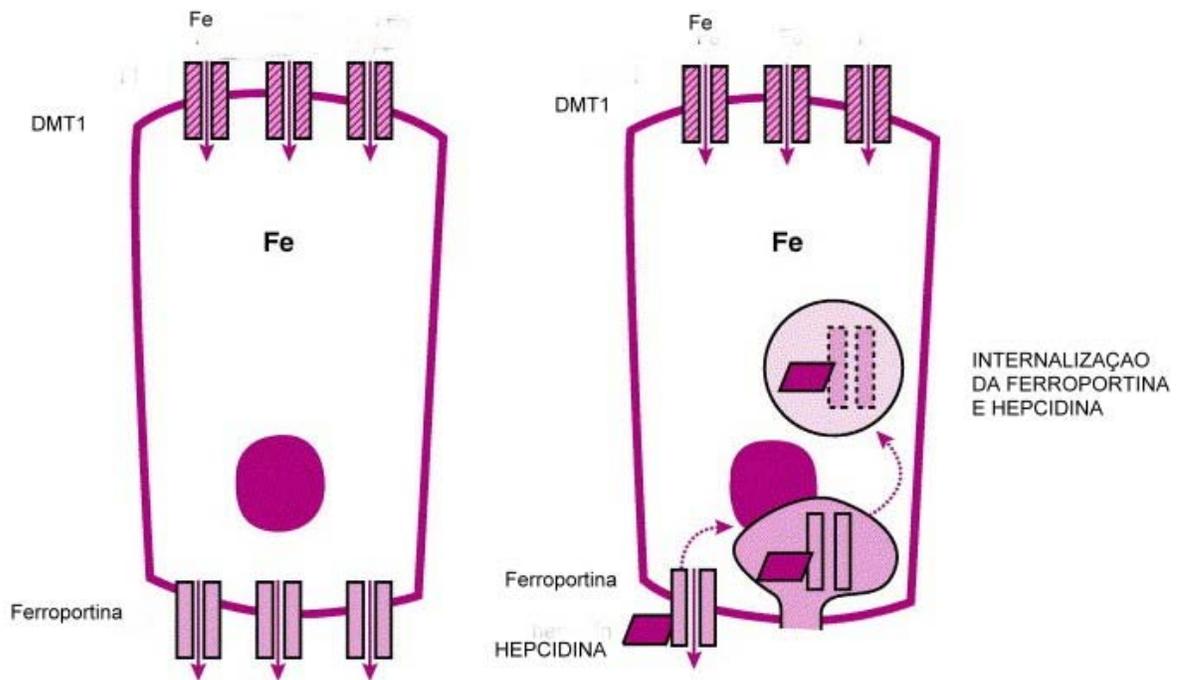


Figura 2- A Hecpidina regulando a expressão de ferroportina na membrana basolateral dos enterócitos.

Esquerda: deficiência de ferro, com expressão de hepcidina diminuída e ferroportina expressa na membrana de basolateral. Nessa situação ocorre a máxima absorção de ferro. Direita: excesso de ferro. O fígado produz hepcidina que interage com as moléculas de ferroportina na membrana basolateral, causando a endocitose e degradação da ferroportina. A exportação de ferro dos enterócitos é diminuída, e as células ficam repletas de ferro. Finalmente, os enterócitos repletos de ferro serão lançados no lúmen do intestino (Nemeth et al 2004b mod.). DMT1=Proteína Transportadora De Metal Divalente 1, Fe= Ferro.

Proteína C reativa (PCR)

Pertence a uma família de proteínas denominada pentraxinas, assim chamada porque forma um pentâmero cíclico composto por 5 subunidades idênticas não glicosiladas e ligadas de forma não covalente, formando uma estrutura discóide muito estável. Cada monômero pesa 23.5 kDa (Baumann e Gauldie, 1994; Xia e Samols, 1997).

A PCR é o protótipo de proteína de fase aguda, com marcada elevação da concentração em resposta a diversos estímulos inflamatórios. Como a maioria das proteínas de fase aguda, é sintetizada exclusivamente no fígado principalmente em resposta à IL-6 e TNF- α (Gabay e Kushner, 1999). Ela começa a ser secretada cerca de 6h após o estímulo, como por exemplo cirurgia, infecção ou enfarte do miocárdio. A partir daí as concentrações duplicam cada 8h, e atingem o pico por volta das 50h. Com estímulos muito intensos a concentração da PCR pode ultrapassar os 500 mg/L ou seja 1000 vezes superior ao basal. Após a suspensão ou cessação do estímulo, os níveis da PCR diminuem rapidamente, apresentando uma meia-vida de 19h. As elevadas concentrações de PCR persistem enquanto o estímulo existir (Pepys e Baltz, 1983, Vigushin et al, 1993, Hogarth et al, 1997). Com a exceção da insuficiência hepática muito grave, a PCR eleva-se sempre que houver um quadro inflamatório, e o seu valor depende da intensidade do estímulo e da velocidade de síntese (Pepys e Baltz, 1983).

A PCR participa do processo inflamatório desestabilizando o RNAm da NO sintase endotelial, diminuindo a liberação da NO basal e estimulada (Verma e Anderson, 2002), aumentando a expressão das moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 pelas células endoteliais (Pasceri et al, 2001), estimulando monócitos a produzirem citocinas inflamatórias (Szmitko et al, 2003) e ativando o sistema complemento (Torzewski et al, 1998; Mold et al, 1999).

A PCR, como a α 1-antitripsina, parece inibir a eritropoiese prejudicando a ligação da transferrina com o seu receptor e prejudicando também a internalização subsequente do complexo receptor da transferrina pelas células eritróides (Peetre et al, 1986).

1.5.2- Fisiopatologia da ADC

Após a breve revisão das principais citocinas e demais proteínas inflamatórias envolvidas na fisiopatologia da anemia associada ao câncer, podemos observar por meio da Figura 3, a interação entre elas e os principais fatores que levam a um menor número de eritrócitos circulantes e à redução na síntese de hemoglobina.

Fatores determinantes da patogênese da ADC e a inter-relação com o processo inflamatório e distúrbios do metabolismo do ferro:

1) Redução da sobrevivência dos eritrócitos: aparentemente, a redução do número de eritrócitos deve-se à eritrofagocitose exacerbada pelos macrófagos estimulados por citocinas. Foi demonstrado *in vitro* que o TNF- α estimula a eritrofagocitose, contribuindo para a destruição precoce dos eritrócitos (Kitagawa et al, 1996). Segundo Means (1999) a diminuição de sobrevivência eritrocitária estaria relacionada a ação de citocinas, como IL-1, e com citocinas mensageiras secundárias, como o óxido nítrico (NO). O INF- γ , diminuindo a expressão dos EPO-Rs, levaria à neocitólise (hemólise seletiva de células eritróides jovens que expressam poucos EPO-Rs e que ativam os macrófagos ao “clearance” de células vermelhas), que associada à menor produção de EPO induzida por citocinas, contribuiria para a instalação da anemia (Alfrey et al, 1997).

2) Distúrbio na homeostasia do ferro: as citocinas tem papel preponderante nos distúrbios do ferro na ADC. O TNF- α e a IL-1 induzem a síntese da ferritina, a aquisição e estoque do ferro pelo sistema reticuloendotelial, limitando a sua disponibilidade para o eritrócito. Além disso a IL-1 e a IL-6 regulam negativamente a expressão do RNAm do receptor da transferrina, o que é compensado pelo maior estímulo da expressão e maior capacidade de transporte da proteína transportadora de ferro divalente (DMT-1), proteína transmembrana do duodeno, capaz de internalizar o ferro ferroso da luz intestinal para dentro do enterócito (Gunshin et al,1997).

O INF- γ estimula a transcrição da ferritina, mas inibe sua tradução (provavelmente induzida pelo NO) (Weiss, 1997), inibe a expressão do RNAm do receptor da transferrina (Byrd et al,1993), aumenta a captação e retenção do ferro ferroso por meio do aumento da expressão do DMT-1 e reduz a expressão da ferroportina, contribuindo para a retenção do ferro nos monócitos (Wardrop e Richardson, 2000).

Assim, as citocinas participam de vários processos que induzem à hipoferremia e hiperferritinemia durante o processo inflamatório crônico. A limitada disponibilidade do ferro para a eritropoiese pode ser evidenciada pelos elevados níveis de zincoprotoporfirina no soro de pacientes com ADC (Hastka et al,1993).

Além da PCR, outras proteínas de fase aguda estão envolvidas no desenvolvimento da ADC. A α 1 anti-tripsina (α 1-AT) é uma delas. É produzida tanto pelos hepatócitos como pelos macrófagos e monócitos (Perlnutter et al,1985;Yuan,1992). Foi demonstrado um efeito inibidor da α 1-AT sobre a ligação da transferrina ao seu receptor em células da placenta in vitro (Graziadei et al,1993), assim como a α 1-AT inibiu a ligação e a internalização da transferrina e seu receptor em células K562 e reticulócitos, além de ter reduzido o crescimento e proliferação de células K562 e o crescimento de BFU-E (células progenitoras eritróides) (Graziadei et al, 1994).

3) Inibição da proliferação e diferenciação eritróides: Várias citocinas inibem o crescimento de progenitores eritróides, mas o IFN- γ parece ser o mais potente (Wang et al, 1995). Tem sido sugerido que as citocinas podem interagir com a formação e função de fatores de crescimento da eritropoiese, como o fator de “stem cell” e a EPO, além de serem capazes de induzir a formação de NO ou radicais tóxicos de oxigênio que

diretamente bloqueiam a eritropoiese, inibindo a biossíntese do heme (Maciejewski et al,1995; Furukawa et al 1995). O TNF- α tem tanto um efeito estimulador como inibidor sobre a hemopoiese. Se combinado com o fator estimulante de colônia de granulócito e monócito (GM-CSF) ou IL-3 inicialmente aumenta a proliferação de células CD34+ em cultura. Entretanto, em culturas de longa duração inibe a maturação e proliferação de células mielóides, provavelmente porque as células permanecem nas fases G0/G1 do ciclo celular (Parker e Pragnell, 1995)

4) Infiltração da medula por microorganismos ou células tumorais: a supressão medular pode ocorrer devido a um efeito direto da invasão das células tumorais ou microorganismos no tecido medular, ou pela ação tóxica dos seus produtos, como demonstrado em pacientes com HIV ou malária (Yap e Stevenson, 1994;Boelaert, 1996).

5) Redução na produção e na resposta à EPO: Um estudo conduzido por Miller et al (1990) em 81 pacientes com tumores sólidos e anemia demonstrou que, para os mesmos níveis de hemoglobina, as concentrações de EPO estavam significativamente mais baixas em paciente com câncer quando comparados com um grupo controle de pacientes com anemia ferropriva. Mais uma vez as citocinas tem um papel importante nesse processo. Foi demonstrado que citocinas inflamatórias como TNF- α , IL-1 α e IL-1 β inibem a produção de EPO induzida pela hipóxia (Faquin et al, 1992). O conceito de que a diminuição da produção da EPO e do efeito do processo inflamatório como participantes da alteração na eritropoiese em pacientes com câncer não é unânime na literatura. Kim et al (2002) em recente estudo com crianças com câncer, mostraram uma elevação significativa da EPO em resposta à redução dos níveis de hemoglobina. Por outro lado, os valores de Tfr não se correlacionaram com os níveis de hemoglobina, sugerindo uma resposta medular ineficiente. Não observaram, ainda, correlação entre os níveis de TNF- α e valores de VHS (Velocidade de Hemossedimentação) com o grau de anemia, o que enfraquece a possibilidade da participação do processo inflamatório na alteração da hemopoiese que causaria a anemia.

Além disso, a resposta à EPO é bastante dependente da presença de uma quantidade suficiente de ferro para a proliferação celular e metabolismo do ferro, condição que está alterada na ADC. Outras deficiências nutricionais como falta de folato ou vitamina B12 também determinam anemia em pacientes com câncer.

1.5.3- Características Laboratoriais da ADC

A ADC possui as seguintes características laboratoriais: apresenta-se como normocrômica/normocítica ou, eventualmente, discretamente microcítica/hipocrômica e com baixa ou normal contagem de reticulócitos. Os estoques de ferro na medula óssea estão adequados ou levemente aumentados, a capacidade de ligação do ferro à transferrina e o ferro sérico estão reduzidos e os níveis de ferritina estão normais ou elevados (Bron et al, 2001). Frequentemente observa-se um aumento de proteínas de fase aguda, tais como a proteína C reativa (PCR), fibrinogênio e alfa 1 antitripsina (Ludwig et al, 1998).

1.6- Diferenciação entre ADC e Anemia Ferropriva

De 20 a 50% dos pacientes com ADC têm diminuição do Volume Corpuscular Médio das hemácias (VCM), sendo frequentemente confundida com anemia ferropriva (AF). A concentração de ferritina é conhecida como o melhor indicador bioquímico do estoque de ferro medular. Porém, como é uma proteína de fase aguda, encontra-se alterada em processos inflamatórios, não sendo um bom indicador da deficiência de ferro em pacientes com câncer (Gupta,2003).

Uma importante associação encontrada em pacientes com câncer é a ADC com a AF, representada em sua maioria por microcitose, altos níveis de sTfR e RDW (Red Cell Distribution Width) aumentado. Nesses casos, além das citocinas que no câncer aumentam a resistência à EPO e inibem a eritropoiese, a falta de ferro contribui para uma menor produção de eritrócitos (Gupta, 2003).

A diferenciação entre AF e ADC e a forma combinada AF/ADC tem sido alvo de diversos estudos. Vários indicadores bioquímicos e índices hematológicos têm sido propostos como úteis nessa diferenciação.

O índice sTfR/log ferritina tem valores mais elevados em pacientes deficientes de ferro com quadro infeccioso ou inflamatório associados, quando comparados com pacientes com ADC sem depleção de ferro (Punnonen et al, 1997). Esse mesmo índice foi

indicado como o melhor marcador para a identificação bioquímica da deficiência funcional de ferro em pacientes sem um processo agudo associado, mas teve sua acurácia reduzida quando da forma combinada deficiência de ferro mais resposta de fase aguda (Thomas et al, 2002).

Kim et al (2002) estudaram pacientes com câncer não hematológicos, subdividindo-os em 2 grupos, de acordo com a presença ou ausência de estoque de ferro medular. Observaram que os parâmetros sTfR, ferritina e índice sTfR/ferritina não foram eficientes para detectar a depleção do ferro. Sugerem que a baixa acurácia do sTfR em pacientes com doenças malignas deve-se provavelmente à reduzida atividade eritropoiética da medula óssea, expressão desproporcional entre TfR celular e sTfR ou a supressão da mobilização do ferro.

Outro estudo usando o sTfR como possível indicador da deficiência de ferro em pacientes com ADC sugere que pacientes com ADC e níveis de sTfR similares aos encontrados na AF podem ser classificados como deficientes de ferro se a saturação de transferrina for baixa. Nesse grupo de pacientes, o valor de RDW foi significativamente mais alto e o VCM significativamente mais baixo do que nos pacientes com ADC clássica (Gupta, 2003).

Segundo Weiss (2002), a administração de complexos contendo ferro em pacientes com câncer deve ser cautelosa considerando que: 1) o ferro é um fator de crescimento essencial e que promove o crescimento e a proliferação de microorganismos e células tumorais; e 2) o ferro possui a capacidade de inibir o sistema imune mediado por células T. Além disso, o aumento dos níveis de ferro é um potencial agente carcinogênico por si só, promovendo danos teciduais e contribuindo para o aumento de células malignas. Daí a importância de se diagnosticar corretamente a deficiência de ferro nesses pacientes, evitando, assim, a suplementação desnecessária.

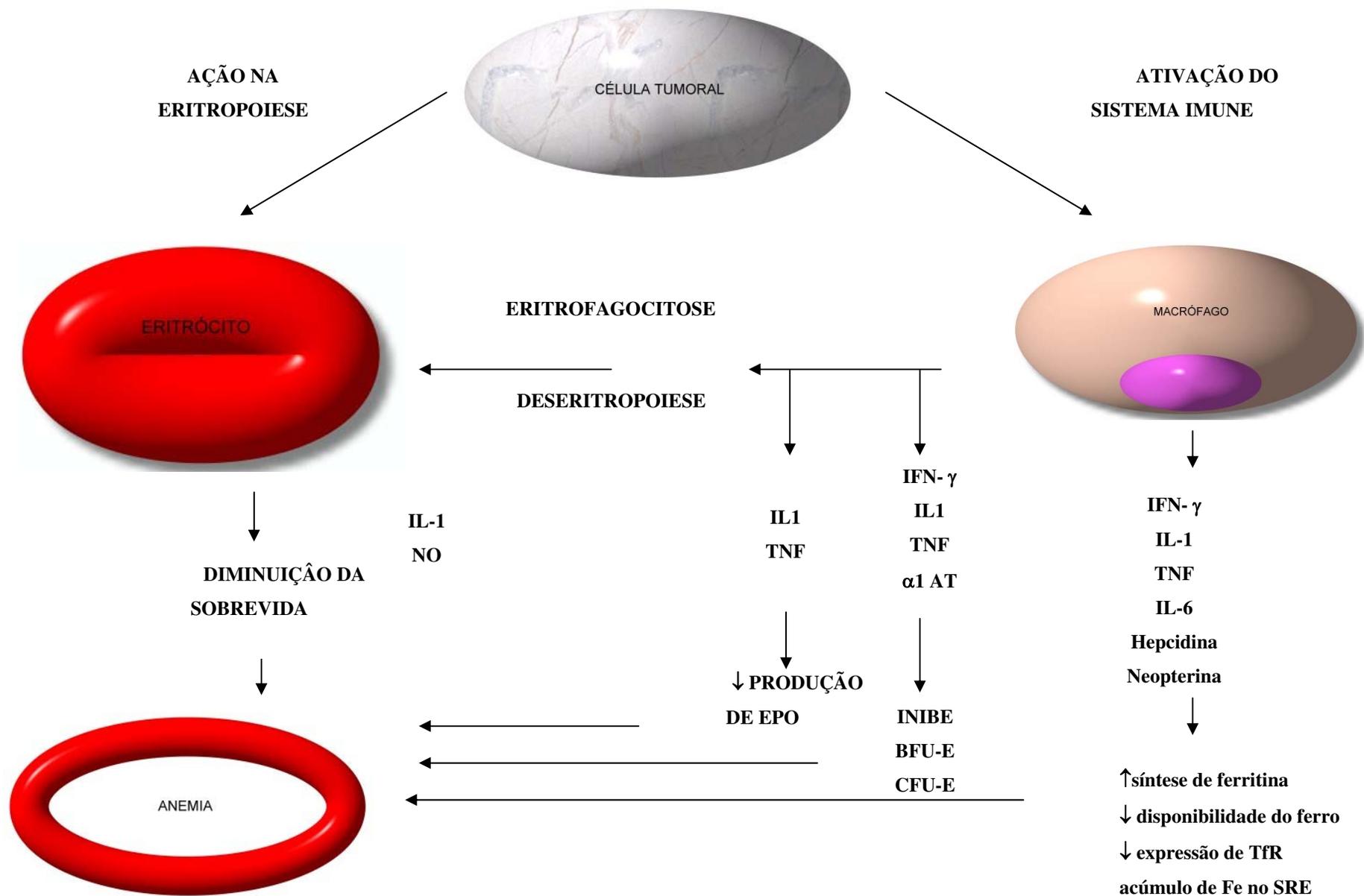


Figura 3- Fisiopatologia da anemia associada ao câncer.(Nowrousian mod. 1998)

2- OBJETIVOS

- 1- Avaliar a anemia em um grupo de pacientes com câncer não hematológico atendidos no Hospital das Clínicas e Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da UNICAMP, independente do tipo de tumor e forma de tratamento.
- 2- Diagnosticar e classificar a anemia em pacientes com câncer por meio de um protocolo laboratorial estabelecido.
- 3- Avaliar a eficiência de diferentes parâmetros laboratoriais na diferenciação das anemias.
- 4- Avaliar a participação de moduladores da resposta inflamatória no metabolismo do ferro e na eritropoiese.

3- CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1- Local do estudo e procedência dos pacientes

O estudo foi desenvolvido no município de Campinas, na Divisão de Patologia do Hospital das Clínicas (HC) da Unicamp e os pacientes foram selecionados nos ambulatório de Oncologia do HC e no Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM).

3.2- Critérios de inclusão de pacientes no estudo

Foram selecionados para esse estudo pacientes adultos de ambos os sexos com diagnóstico de tumores sólidos com ou sem tratamento por radioterapia e/ou quimioterapia.

O protocolo deste estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp e do CAISM.(aprovações em anexos).

A participação no projeto foi voluntária. Os pacientes deram consentimento por escrito concordando com sua participação nesse estudo.

3.3- Critérios de exclusão de pacientes no estudo

Foram excluídos pacientes com câncer hematológicos, pacientes em uso de eritropoetina, medicação contendo ferro, vitamina B12 ou ácido fólico e pacientes transfundidos há menos de 120 dias.

3.4- Casuística e métodos

Para definir o tamanho amostral recorreremos ao setor de Estatística da Faculdade de Ciências Médicas que, por meio de um cálculo baseado na proporção de anemia em pacientes com câncer rotineiramente atendidos na Divisão de Patologia Clínica, determinou que o número mínimo de indivíduos a serem estudados seria de 382 pacientes. .

A partir do cálculo amostral, participaram da pesquisa 402 pacientes com tumores sólidos, sendo 195 do sexo feminino e 207 do sexo masculino, na faixa etária entre 21 e 88 anos.

Os pacientes tiveram 20 ml de sangue coletado, em jejum, em três tubos: um tubo com EDTA trissódico (para avaliação dos parâmetros hematimétricos), um com citrato de sódio (para realização de VHS) e outro com gel ativador de coágulo para avaliação do metabolismo do ferro, e marcadores inflamatórios.

Foram classificados como anêmicos todos os pacientes que apresentavam níveis de hemoglobina inferiores a 12 g/dL.(Theurl et al, 2006;Thomas e Thomas 2005).

Os pacientes foram divididos nos seguintes grupos :

a) Pacientes com câncer sem anemia (com hemoglobina superior ou igual a 12 g/dl) perfazendo um total de 262 pacientes. Desse grupo foram selecionados 30 pacientes para realizarmos todas as análises laboratoriais. O critério para seleção desses 30 pacientes foi aleatório, por ordem de entrada no estudo, sendo homogêneo em relação ao sexo. A seleção de 30 pacientes foi realizada visando a otimização da utilização dos recursos, tendo em vista o alto custo dos reagentes.

b) Pacientes com câncer e anemia (com hemoglobina inferior a 12 g/dl) perfazendo um total de 140 pacientes.

3.5- Análises realizadas

Foram realizadas dosagens laboratoriais relacionadas a avaliação da eritropoiese, metabolismo do ferro e parâmetros envolvidos na resposta inflamatória.

3.5.1- Avaliação da eritropoiese

Para avaliação da eritropoiese foram realizadas as seguintes determinações:

Hemograma completo utilizando contador automatizado hematológico Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe , Japan).

Contagem de reticulócitos automatizada por citometria de fluxo com o uso de um marcador fluorescente de RNA (polimetina), no analisador hematológico automatizado Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe , Japan).

Medida do tamanho médio do reticulócito (RET-Y), utilizando contador automatizado hematológico Sysmex XE 2100 (Sysmex Corporation, Kobe , Japan).

Nos pacientes com hemoglobina inferior a 12 g/dl foi realizada a dosagem de eritropoetina (EPO), por ensaio imunoenzimático por eletroquimioluminescência utilizando o Kit Immulite EPO, e o leitor Immulite 2000 (DPC- Los Angeles, EUA).

O exame da morfologia das células sangüíneas foi realizado pela análise microscópica em extensão sangüínea corada por Leishman .

3.5.2- Avaliação do metabolismo do ferro

Ferro sérico (Fe): ensaio colorimétrico (Synermed, Westfield, IN, USA).

Capacidade Total de Ligação do ferro (TIBC): ensaio colorimétrico (Synermed, Westfield, IN, USA).

Ferritina (FTNA): ensaio imunoenzimático por eletroquimioluminescência ,Kit Ferritin Immulite e o leitor Immulite 2000 (DPC, Los Angeles, EUA).

Índice de saturação da transferrina (IST): calculado pela fórmula ferro sérico/TIBC X 100) e expresso em percentagem.

Receptor solúvel da transferrina (sTfR):nefelometria no sistema de automação BN 100 (Dade Behring, Marburg, GmgH, Germany).

Foi calculado também o índice sTfR/log FTNA.

3.5.3- Avaliação de parâmetros envolvidos na resposta inflamatória

Dosagem de Proteína C Reativa (PCR): nefelometria no sistema de automação BN 100 (Dade Behring, Marburg, GmgH, Germany)

Velocidade de hemossedimentação (VHS) : sistema de automação Sedisystem (Beston Dickinson Division Vacutainer, Meylan, France).

Dosagem das Interleucinas IL-6, IL-1 β e TNF- α : método imunoenzimático tipo sanduíche (ELISA) com anticorpos monoclonais Quantikine HS (R & D System, MN,USA)

Dosagem de Pró-Hepcidina (Pró-Hep): ELISA competitivo (DRG Instruments GmbH DRG International, Germany).

Dosagem de neopterin (Neop): ELISA competitivo (IBL, Hamburg, Germany).

A tabela 1 mostra os valores de referência de acordo com os fabricantes para os parâmetros séricos estudados.

Tabela 1-Valores de referência (recomendados pelos fabricantes)

Variáveis	Valor de referência
Fe	H:40 a 160
(ug/dl)	M: 30 a 160
TIBC	250 à 400
(ug/dL)	
IST	33 e 55
(%)	
FTNA	H:30 a 450
(ng/ml)	M:13 a 150
sTfR	0,76 a 1,76
(mg/L)	
PCR	< 5,0
(mg/dl)	
IL-6	0,447 a 9,96
(pg/ml)	
IL-1 β	ND a 1,996
(pg/ml)	
TNF- α	ND a 4,71
(pg/mL)	
Pró-Hep	SI
(ng/ml)	
Neop	< 10
(nmol/L)	
EPO	3,7 a 29,5
(mIU/ml)	
VHS	10 a 15
(mm ³)	

H = homens, M=mulheres,Fe = Ferro, TIBC =Capacidade Total de Ligação de Ferro, IST= Índice de Saturação da Transferrina, FTNA = ferritina, sTfR= Receptor solúvel da transferrina , PCR= Proteína C Reativa, IL-6=Interleucina 6, IL-1 β = Interleucina 1 beta , ND= Não detectável,TNF- α = Fator de necrose Tumoral alfa , Pró-Hep = Pró- hepcidina, SI= Sem informação, Neop = Neopterina, EPO= Eritropoetina e VHS=velocidade de hemossedimentação.

3.6- Classificação do tipo de anemia

Os pacientes com câncer e valores de hemoglobina abaixo de 12 g/dl foram classificados como anêmicos (Theurl et al 2006, Thomas e Thomas 2005) e de acordo com os critérios abaixo, os pacientes foram classificados em AF, ADC ou anemia relacionada ao câncer (ARC).

Foram adotados alguns critérios para o diagnóstico de AF, ADC e ARC, segundo uma revisão de dados da literatura (Chua et al, 1999; Kruiper-Kramer et al, 1997; Nagral et al, 1999; Wians et al, 2001; Ullrich et al, 2005; Choi e Pai, 2003; Opasich et al, 2005)

Critérios adotados para o diagnóstico de AF:

- Fe: ≤ 50 $\mu\text{g/dl}$ para homens e ≤ 40 $\mu\text{g/dl}$ para mulheres
- IST: $< 15\%$
- FTNA: ≤ 50 ng/ml

Critérios adotados para o diagnóstico de ADC:

- Fe: ≤ 50 $\mu\text{g/dl}$ para homens e ≤ 40 $\mu\text{g/dl}$ para mulheres
- FTNA : ≥ 100 ng/ml

Critérios adotados para o diagnóstico de ARC:

- Fe normal
- IST $> 15\%$
- FTNA: normal ou elevada
- Contagem de reticulócitos : normal
- Dosagem de bilirrubinas: normal
- VCM: normal
- Eletroforese de Hb: normal

3.7- Análise estatística

A comparação entre os grupos foi feita pelo teste de Análise de variância (ANOVA) com transformação Rank, para diminuir a assimetria e variabilidade dos dados. Quando a diferença entre os grupos foi significativa foi realizado o teste de Tukey para identificar as diferenças.

A correlação entre os diversos parâmetros laboratoriais foi testada por meio da determinação do coeficiente de correlação de Spearman. O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p \leq 0.05$).

Na determinação do ponto de corte entre os parâmetros, para discriminar os diferentes grupos utilizou-se a estimação da Curva ROC. Foram determinados os valores de maior sensibilidade e especificidade de cada parâmetro.

Os programas computacionais utilizados foram: The SAS System for Windows (Statistical Analysis System), versão 8.02. (SAS Institute Inc, 1999-2001, Cary, NC, USA.), SPSS for Windows (Statistical Package for the Social Sciences), versão 10.0.7 (SPSS Inc, 1989-1999, Chicago, IL, USA), Microcal Origin, versão 5.0. (Microcal Software Inc, 1991-1997, Northampton, MA, USA), Minitab for Windows, versão 12.1. (Minitab Inc, 1998, State College, PA, USA.)

Todas as análises estatísticas foram realizadas pela Comissão de Pesquisa - Estatística da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

4- RESULTADOS

4.1- Descrição da população

Foram estudados 402 pacientes com diversos tipos de câncer, sendo mais freqüentes os tumores de intestino, seguidos pelos tumores de mama, cabeça e pescoço, próstata e gástrico (Tabela 2).

Tabela 2- Distribuição dos tipos de cânceres de acordo com a localização

Tipo de câncer (n=402)	Freqüência	Percentual (%)
Intestino	122	30,3
Mama	53	13,2
Cabeça e Pescoço	50	12,4
Próstata	48	11,9
Gástrico*	47	11,6
Pulmão	34	8,5
Ginecológico**	18	4,5
Genitourinário	13	3,2
Diversos***	9	2,2
Fígado	5	1,24
Pele	3	0,7
Total	402	100

*Gástrico: esôfago e estômago,** Ginecológico: útero e ovário,*** Diversos: Abdômen (1),Coxa (1), partes moles (2), pelve (1), tórax (1) e veia cava (1) e metástase óssea (2).

4.2- Avaliação do tipo de anemia

Dos 402 pacientes estudados 140 apresentaram anemia com níveis de hemoglobina inferiores a 12 g/d, representando um percentual de 34.8% do total.

Dos 140 pacientes com anemia, 105 puderam ser classificados de acordo com os critérios descritos anteriormente (em Métodos). Em 35 pacientes não foi possível classificar a anemia devido à insuficiência de resultados laboratoriais (Tabela 3).

Tabela 3- Frequência dos tipos de anemia em pacientes com câncer

Tipo de Anemia	Frequência	Percentual
ARC	52	37,1
ADC	29	20,7
AF	24	17,1
NC	35	25,0

ARC: Anemia Relacionada ao Câncer , ADC: Anemia de Doença Crônica, AF: Anemia Ferropriva, NC: não classificados.

4.2.1- Descrição dos grupos de acordo com o tipo de anemia

A Tabela 4 mostra a distribuição dos tipos de câncer separados pelos grupos com e sem anemia. Como pode ser observado, os cânceres de intestino e gástricos foram os mais frequentes nos três tipos de anemia.

A análise dos tipos de câncer e tipo de tratamento foi apenas descritiva, visto que não era objetivo do trabalho estudar a anemia em relação aos tipos de câncer ou formas de tratamento.

Tabela 4- Distribuição por localização dos cânceres nos diversos grupos de pacientes

Tipo de câncer	ARC		ADC		AF		CSA	
	F	%	F	%	F	%	F	%
Cabeça e Pescoço	8	15,4	5	17,2	2	8,3	3	10,0
Diversos	2*	3,9	1**	3,4	-	-	2***	6,7
Fígado	2	3,9	-	17,4	-	-	2	6,7
Gástrico	9	17,3	5	6,9	7	29,2	-	-
Ginecológico	3	5,8	2	-	1	4,2	2	6,7
Genitourinário	3	5,8	-	20,6	-	-	-	-
Intestinal	14	26,9	6	20,7	10	41,7	11	36,7
Mama	4	7,7	2	6,9	4	16,7	3	10,0
Próstata	2	3,9	1	3,4	-	-	2	6,7
Pulmão	5	9,6	7	24,1	-	-	5	16,7

ARC= anemia Relacionada ao Câncer, ADC = Anemia de Doença Crônica, AF = Anemia Ferropriva, CSA= Câncer sem anemia .F = frequência, %= percentual, * 2 pacientes com metástase óssea, **câncer em partes moles,*** câncer de pele.

A quimioterapia foi a forma de tratamento mais frequentemente utilizada em todos os grupos de pacientes com anemia e também no grupo de pacientes sem anemia. No grupo de pacientes com ADC 20% não estavam em tratamento no momento em que foram estudados. (Tabela 5). Em anexos encontra-se a distribuição do tipo de tratamento por localização do câncer.

Tabela 5- Frequência dos diversos tipos de terapêutica nos grupos com e sem anemia.

Terapia	ARC	ADC	AF	CSA
Q	58%	66%	48%	53%
R	2%	-	4%	13%
Q+R	31%	14%	9%	27%
ST	9%	20%	39%	7%

ARC= anemia Relacionada ao Câncer, ADC = Anemia de Doença Crônica, AF = Anemia Ferropriva, CSA= Câncer sem anemia . R= Radioterapia; Q= quimioterapia; R+Q= Radioterapia com quimioterapia associada; ST= sem tratamento radio ou quimioterápico

4.3- Avaliação laboratorial

4.3.1- Avaliação hematológica e do estado do ferro

A Tabela 6 mostra resultados referentes aos valores hematimétricos e relacionados ao metabolismo do ferro nos três tipos de anemia e no subgrupo de pacientes com câncer sem anemia. Os resultados por pacientes constam em anexos.

Analisando inicialmente os dados hematimétricos, não houve diferença significativa entre os níveis de hemoglobina entre os três grupos de anemia (Figura 4). Os valores de VCM nos pacientes com AF foi significativamente menor do que nos pacientes com ARC, mas não houve diferença entre ADC e AF (Figura 5) .

Embora não tenha havido diferença quanto às contagens absolutas de RET, os valores de RET-Y, que representam o tamanho e conteúdo de Hb nos RET, foi significativamente menor nos grupos com AF e ADC quando comparados com os grupos ARC e CSA (Figura 6).

Como esperado, pacientes com AF apresentaram valores menores de IST e FTNA e valores de TIBC significativamente superiores a todos os outros grupos.

Os níveis de sTfR e sTfR/log FTNA foram significativamente maiores em pacientes com AF, quando comparados aos outros tipos de anemia ou em pacientes sem anemia, (Figuras 7 e 8).

Os pacientes sem anemia mostraram níveis séricos de FTNA significativamente menores do que os pacientes com ADC, mas níveis similares aos pacientes com ARC ($p=0,0717$).

Em relação à EPO, o grupo com AF apresentou níveis significativamente superiores aos com ARC, mas similares ao grupo com ADC (Figura 9).

Tabela 6- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do ferro nos três tipos de anemia e no subgrupo de pacientes com câncer sem anemia. Valores em mediana (mínimo e máximo).

	AF (n= 24)	ADC (n= 29)	ARC (n=54)	CSA (n= 30)	p ANOVA
Hb (g/dl)	10,7 ^a (8,5-11,8)	10,4 ^a (8,0-11,9)	11,0 ^a (7,6-11,9)	13,6 ^b (12,0-16,0)	< 0,001
VCM (fl)	79,8 ^a (66,5-93,1)	85,9 ^a (76,7-101,9)	91,7 ^b (72,2-115,5)	92,4 ^b (81,3-99,1)	< 0,001
RET (x10 ⁹ /l)	56,4 ^a (11,0-113,1)	51,3 ^a (11,0-79,0)	58,0 ^a (13,0-100,1)	62,8 ^a (36,9-98,9)	0,188
RET-Y	1677 ^a (1359 – 1930)	1759 ^a (1552 – 1939)	1929 ^b (1775 – 2146)	1903 ^b (1794 – 2006)	<0,001
Fe (mg/dl)	41,0 ^a (21,0-77,0)	32,0 ^a (11,0-51,0)	72,0 ^b (44,0-323,0)	77,0 ^b (42,0-245,0)	< 0,001
TIBC (mg/dl)	421,5 ^a (264,0-575,0)	229,0 ^b (112,0-377,0)	281,0 ^c (180,0-458,0)	348,0 ^a (219,0-551,0)	< 0,001
IST (%)	9,8 ^a (4,6-17,3)	12,8 ^a (6,1-26,7)	24,8 ^b (15,,6-103,7)	22,2 ^b (10,3-90,0)	< 0,001
sTfR (mg/l)	2,4 ^a (1,1-8,5)	1,7 ^b (0,1-3,5)	1,7 ^b (0,7-4,1)	1,5 ^b (0,7-2,4)	< 0,001
sTfR/log FTNA	1,6 ^a (0,9-11,7)	0,6 ^b (0,1-1,2)	0,7 ^b (0,2-1,4)	0,7 ^b (0,3-1,4)	< 0,001
FTNA (ng/ml)	18,5 ^a (2,8-128,6)	339,8 ^b (62,5-2646,0)	200,1 ^{b,c} (50,0-154,5)	171,2 ^c (37,8-1179,0)	< 0,001
EPO (mIU/ml)	37,0 ^a (12,8-94,6)	27,0 ^{a,b} (9,4-241,0)	26,3 ^b (6,6-880,0)	15,3 ^c (7,1-36,9)	< 0,001

Hb=hemoglobina, VCM=Volume corpuscular médio, Ret = contagem de reticulócitos absoluta, RET Y=Tamanho médio dos reticulócitos, Fe = Ferro, TIBC= Capacidade Total de Ligação de Ferro, IST= Índice de saturação da Transferrina , sTfR = Receptor solúvel da transferrina, FTNA = ferritina, EPO= Eritropoetina. CSA= Câncer sem anemia, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC= Anemia de Doença Crônica e AF= Anemia Ferropriva. Os grupos que apresentam letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5% de acordo com o teste de Tukey.

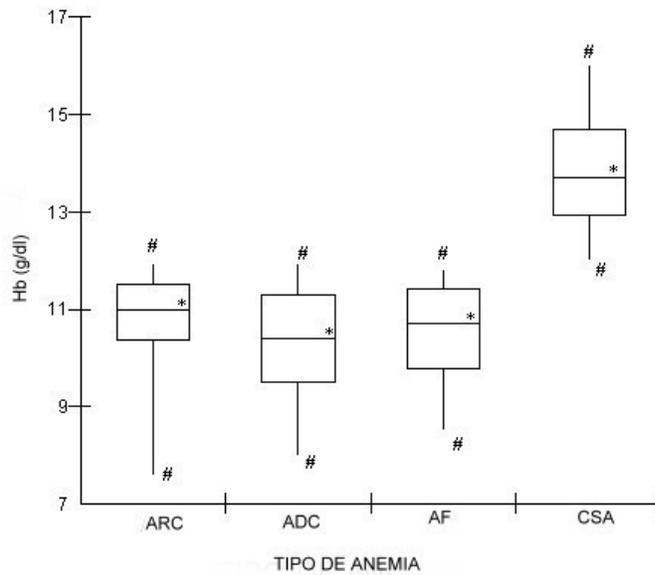


Figura 4- Boxplots referentes à Hb em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. Hb = Hemoglobina., ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC=Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

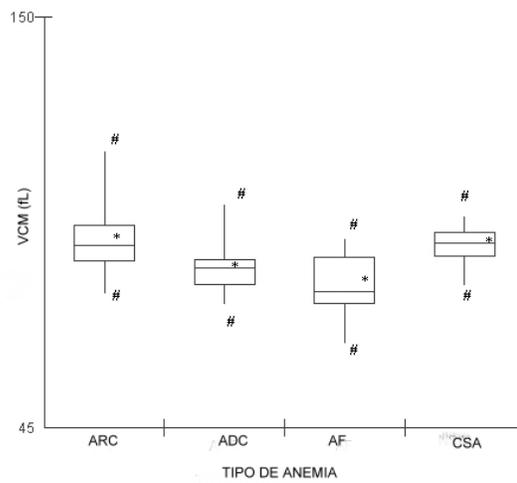


Figura 5- Boxplots referentes ao VCM em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. VCM = Volume Corpuscular Médio., ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

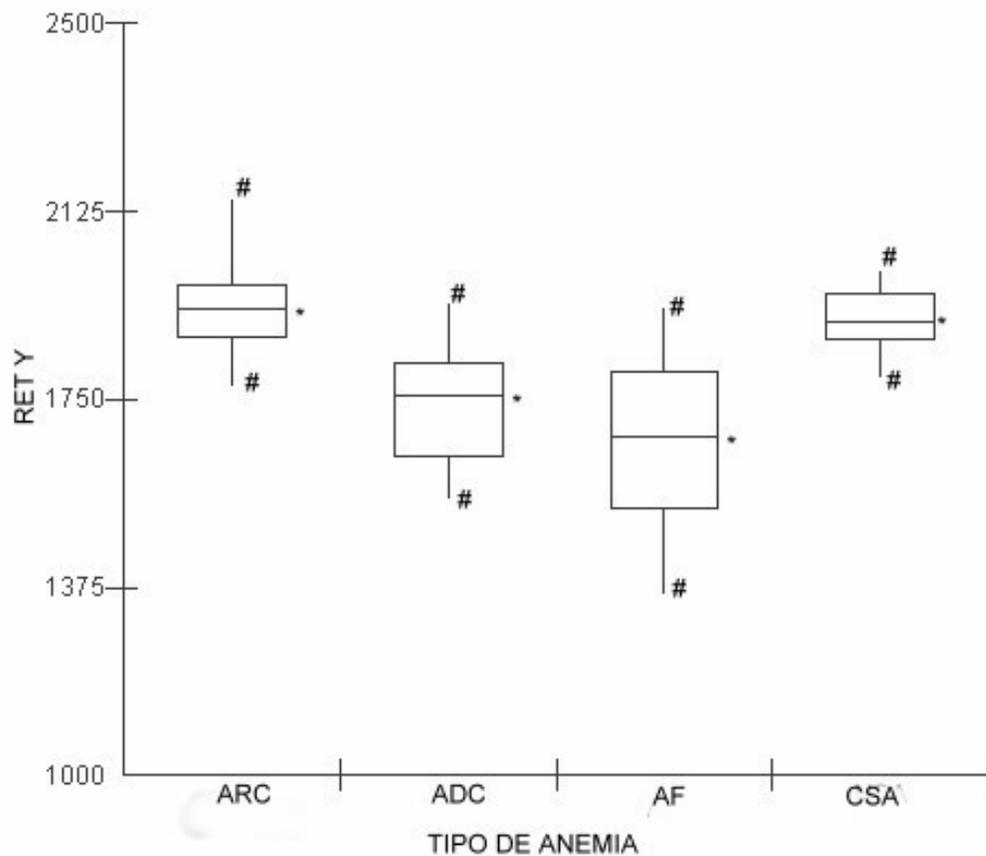


Figura 6- Boxplots referentes ao RET-Y em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. RET-Y = Volume médio do reticulócito, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

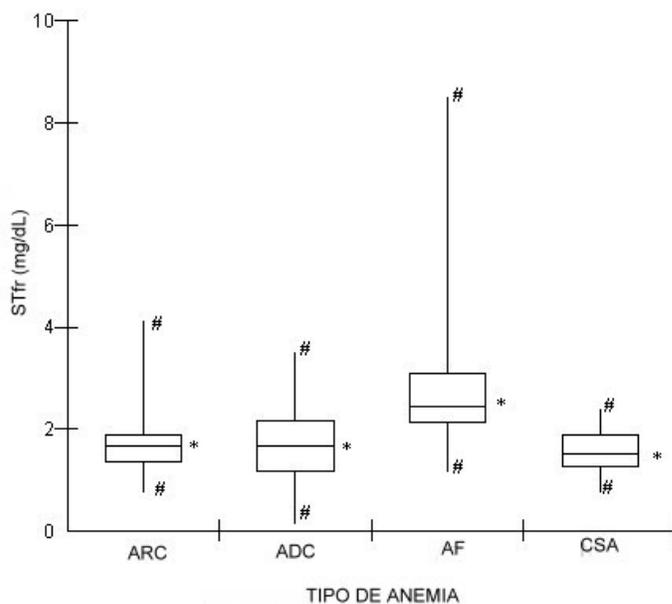


Figura 7- Boxplots referentes ao sTfR em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. STfR = Receptor solúvel da Transferrina , ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

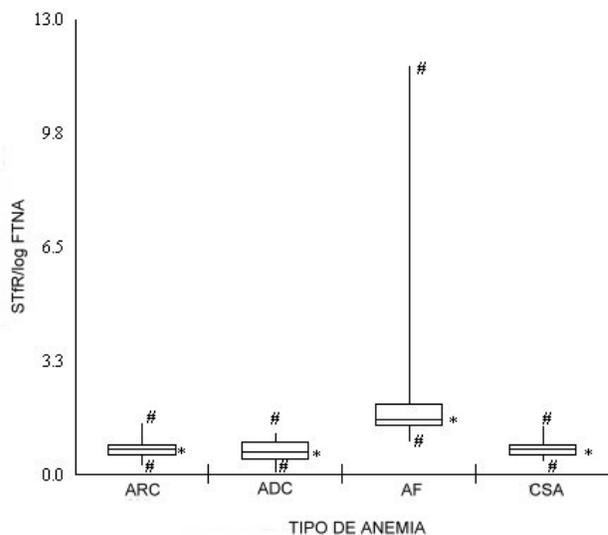


Figura 8- Boxplots referentes ao sTfR/log FTNA em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. STfR = Receptor solúvel da Transferrina dividido pelo logaritmo da Ferritina., ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

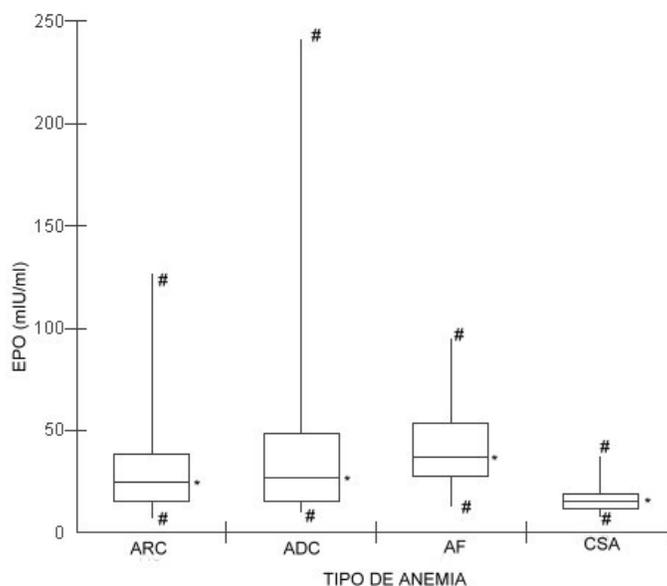


Figura 9- Boxplots referentes à EPO em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. EPO = Eritropoetina, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC = Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

4.3.2- Avaliação da atividade inflamatória

A Tabela 7 mostra os valores referentes aos parâmetros relacionados à resposta inflamatória nos grupos com anemia e no grupo CSA.

Foram observados valores significativamente maiores de PCR, VHS, IL-6 e IL1- β e nos pacientes com ADC, quando comparados com pacientes com AF, ARC ou CSA (Tabela 7 e Figuras 10,11,12 e 13).

Analisando o conjunto de pacientes como um todo e subdividindo-o apenas de acordo com os valores de PCR, observamos que o grupo de pacientes com PCR \geq 0,50 mg/dl apresentou níveis séricos de IL-6 significativamente mais altos (mediana = 10,18; intervalo 1,42-249,30) do que o grupo de pacientes com PCR < 0,50 mg/dl (mediana = 3,22 ; intervalo 0,00-57,40). Quando esses aspectos foram analisados de acordo com o tipo de anemia, foi observado não haver diferença em relação

aos níveis de IL-6 quando a PCR era $< 0,50$ mg/dl. Entretanto quando os valores de PCR eram $\geq 0,50$ mg/dl, os maiores níveis de IL-6 foram observados no grupo com ADC (ADC X ARC: $p= 0,002$ e ADC X CSA: $p= 0,001$). Pacientes com AF e CSA com PCR $\geq 0,50$ mg/dl mostraram níveis de IL-6 estatisticamente diferentes, sendo superiores no grupo com AF ($p= 0,027$).

Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto aos valores de TNF- α ($p= 0,257$), neopterina ($p=0,223$) e Pró-Hepcidina ($p= 0,076$). Igualmente não houve diferença significativa nos valores de TNF- α , Neopterina e Pró-hepcidina quando os grupos foram separados pelos níveis de PCR ($\geq 0,50$ and $< 0,50$ mg/dl).

Embora não tenha havido diferença nos níveis de NP entre os grupos de pacientes com câncer, quando esses grupos foram comparados com um grupo de 26 indivíduos normais (pacientes de uma soroteca do laboratório de Patologia Clínica do HC), foi observado que pacientes com neoplasias apresentam valores significativamente mais elevados (mediana do grupo normal 3,95 nmol/l , intervalo de 2,20 a 7,50 nmol/l) do que o grupo com ARC ($p < 0,001$), ADC ($p < 0,001$), AF ($p= 0,001$) e CSA ($p < 0,001$).

Tabela 7- Parâmetros de marcadores inflamatórios nos três tipos de anemia e no subgrupo de pacientes com câncer sem anemia. Valores em mediana (mínimo-máximo)

	AF (n= 24)	ADC (n=29)	ARC (n= 54)	CSA (n=30)	p * ANOVA
PCR (mg/dl)	0,41 ^a (0,02-12,60)	7,36 ^b (0,49-29,30)	0,70 ^a (0,02-16,30)	0,33 ^b (0,02-5,72)	< 0,001
VHS (mm)	60,00 ^{a,c} (20,00-130,00)	126,50 ^b (57,00-449,00)	84,50 ^a (12,00-134,00)	47,50 ^c (4,00-131,00)	< 0,001
IL-6 (pg/ml)	3,79 ^{a,b} (0,80-32,10)	10,77 ^c (1,14-249,30)	6,63 ^a (0,00-57,40)	2,85 ^b (0,00-1930,20)	<0,005
IL-1β (pg/ml)	0,22 ^a (0,03-1,58)	0,46 ^b (0,01-7,96)	0,23 ^a (0,04-7,41)	0,11 ^a (0,02-0,94)	< 0,030
TNFα (pg/ml)	1,99 ^a (0,84-21,13)	2,62 ^a (1,11-14,08)	1,96 ^a (0,81-24,39)	1,86 ^a (0,10-39,03)	0,257
Neop (nmol/L)	8,25 ^a (4,80-14,00)	9,60 ^a (3,60-78,00)	9,10 ^a (5,00-85,00)	9,20 ^a (5,00-81,00)	0,223
Pró-Hep (ng/ml)	210,10 ^a (57,10-386,00)	255,90 ^a (96,00-479,00)	261,50 ^a (138,80-1222,00)	230,90 ^a (109,80-847,00)	0,076

*Valores de p referentes à comparação entre o grupo ADC com os grupos AF, AC e CSA. Não houve diferença significativa na comparação entre os outros grupos estudados.

ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia, p = Coeficiente de correlação de Pearson, PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1β= Interleucina 1 beta , TNFα= Fator de necrose Tumoral alfa, Neop = Neopterina , Pró-Hep = Pró- hepcidina. Os grupos que apresentam letras diferentes são significativamente diferentes ao nível de 5% de acordo com o teste de Tukey.

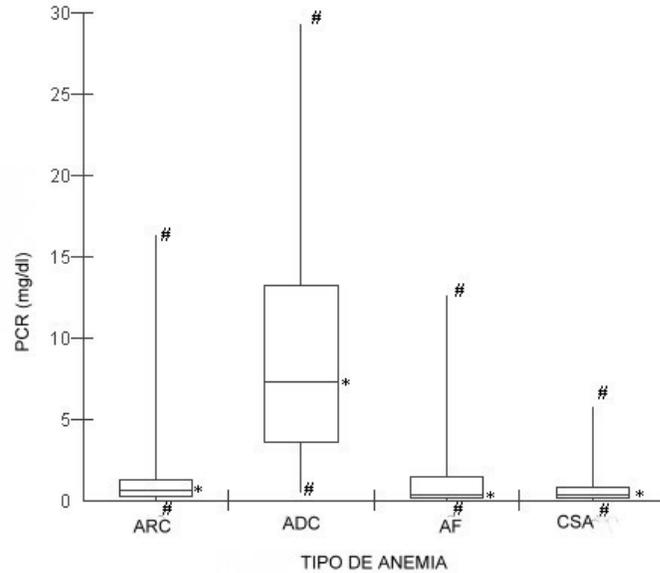


Figura 10- Boxplots referentes à PCR em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. PCR= Proteína C Reativa, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC=Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

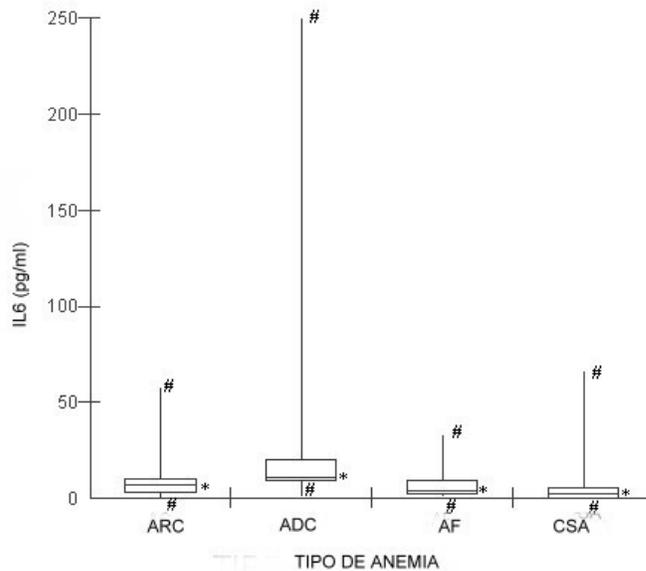


Figura 11- Boxplots referentes à IL-6 em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. IL-6= Interleucina 6 ,ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC= Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

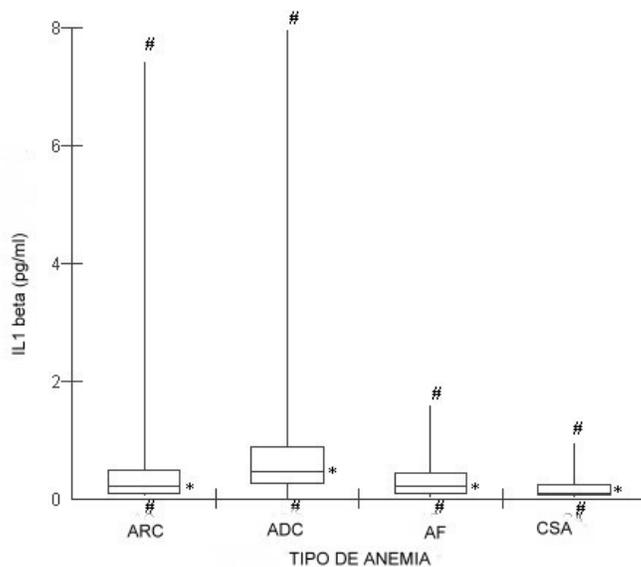


Figura 12- Boxplots referentes à IL-1 beta em todos os grupos estudados.

* mediana # mínimo e máximo. IL-1= Interleucina 1, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

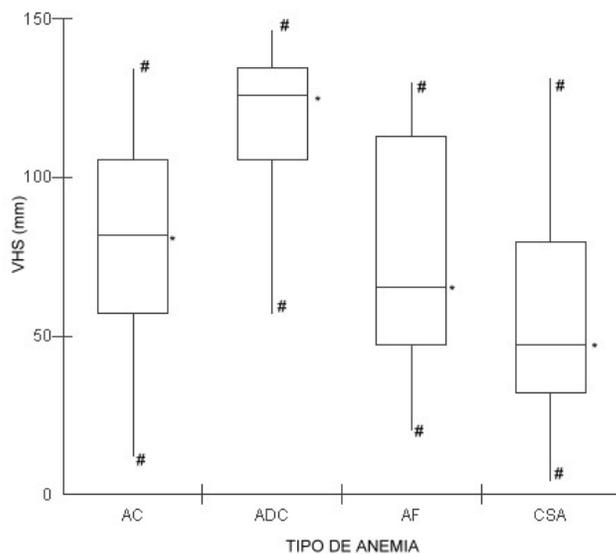


Figura 13- Boxplots referentes ao VHS em todos os grupos estudados

* mediana # mínimo e máximo. VHS= Velocidade de hemossedimentação ,ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, CSA = Câncer sem anemia.

4.4- Correlações entre as variáveis estudadas

4.4.1- Correlação entre atividade inflamatória e anemia

A Tabela 8 mostra as correlações entre os parâmetros relacionados com o processo inflamatório e dois parâmetros relacionados à anemia: EPO e Hb.

Como pode ser observado, a ação de fatores pró-inflamatórios IL-6 e PCR aparentemente exercem um efeito negativo sobre os níveis de Hb somente no grupo com ADC, o que, por sua vez, leva à uma maior liberação de EPO. Embora no grupo com CSA todos os pacientes tivessem valores de Hb > 12,0 g/dl, houve uma correlação inversa entre Hb e VHS, sugerindo que nos pacientes embora sem anemia já haveria uma tendência a menores níveis de Hb nos indivíduos com maior atividade inflamatória detectada por valores anormalmente altos de VHS.

Tabela 8- Coeficiente de correlação (Spearman) entre as variáveis relacionadas com a anemia e com a atividade inflamatória nos diversos grupos estudados.

Variáveis	ARC		ADC		AF		CSA	
	r	p	r	p	r	p	r	p
Hb X IL1-β	-0,118	0,419	-0,308	0,110	-0,414	0,044	0,103	0,621
Hb X IL-6	0,023	0,873	-0,612	0,001	-0,341	0,110	-0,347	0,097
Hb X VHS	0,278	0,081	-0,409	0,052	0,383	0,095	-0,680	0,001
Hb x Pro-Hep	0,214	0,134	-0,125	0,532	-0,002	0,992	-0,155	0,458
Hb x Neop	-0,187	0,187	-0,056	0,774	-0,174	0,437	-0,068	0,724
Hb x TNF-α	0,194	0,211	-0,113	0,606	-0,353	0,098	-0,117	0,536
Hb x PCR	0,104	0,475	-0,467	0,012	0,278	0,188	-0,156	0,409
Hb X FTNA	-0,295	0,035	-0,624	0,001	-0,204	0,349	-0,126	0,539
EPO x IL-1β	-0,074	0,618	0,296	0,125	0,175	0,412	-0,188	0,378
EPO X IL-6	0,127	0,416	0,401	0,034	0,246	0,257	0,162	0,458
EPO X PCR	0,162	0,281	0,520	0,005	0,287	0,207	0,288	0,128
EPO x Pro-Hep	-0,007	0,964	-0,251	0,205	-0,153	0,473	-0,153	0,473
EPO x Neop	-0,081	0,593	-0,126	0,513	0,259	0,243	0,373	0,050
EPO x TNF-α	0,010	0,949	0,206	0,345	0,224	0,303	0,063	0,742
EPO X VHS	0,173	0,311	0,331	0,122	0,303	0,192	0,391	0,043

r: coeficiente de Spearman. Os valores significativos estão representados em negrito.

Hb=Hemoglobina, EPO=Eritropoetina, PCR=Proteína C Reativa, VHS=velocidade de Hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1β=Interleucina 1 beta, TNFα=Fator de necrose Tumoral alfa, Neop=Neopterina, Pró-Hep = Pró- hepcidina.

4.4.2- Correlação entre atividade inflamatória e o metabolismo do ferro

Com o intuito de correlacionarmos uma possível ação da atividade inflamatória no metabolismo do ferro, os níveis de IL-6, PCR, VHS, TNF- α , IL1- β , Neop e Pró-Hep foram correlacionados aos valores de Fe, FTNA, IST, sTfR e sTfR/log FTNA (Tabela 9).

O grupo com câncer com AF apresentou o maior número de correlações entre os marcadores inflamatórios e o metabolismo do ferro. Embora essas correlações possam ser consideradas fracas, aparentemente as proteínas de fase aguda exercem uma ação negativa sobre os componentes da fase funcional do metabolismo do ferro (Hb, Fe, TIBC e sTfR). Comportamento semelhante foi observado no grupo com ARC. As correlações FTNA x VHS e FTNA x PCR eram esperadas, já que esses três parâmetros são considerados indicadores de atividade inflamatória.

Tabela 9- Coeficiente de correlação (Spearman) entre as variáveis relacionadas com a atividade inflamatória e o metabolismo do ferro.

Variáveis	ARC		ADC		AF		CSA	
	r	p	r	p	r	p	r	p
FTNA X IL1- β	-0,008	0,958	-0,411	0,030	0,044	0,842	0,019	0,928
FTNA X IL-6	0,163	0,277	0,318	0,098	0,536	0,010	0,047	0,835
FTNA X PCR	0,403	0,005	0,537	0,003	0,404	0,077	0,415	0,035
FTNA X TNF- α	-0,135	0,388	0,218	0,317	-0,039	0,863	0,426	0,030
FTNA x Neop	0,066	0,646	-0,189	0,325	0,065	0,779	0,337	0,092
FTNA X VHS	0,333	0,035	0,424	0,043	0,542	0,016	0,470	0,017
FTNA X Pró-Hep	-0,086	0,547	0,405	0,032	0,229	0,284	0,290	0,201
Pró-Hep X STFR	-0,086	0,546	0,405	0,032	0,229	0,024	-0,005	0,979
IL-6 X FE	-0,315	0,030	0,003	0,985	-0,261	0,009	-0,362	0,081
IL-6 X STFR/log FTNA	-0,339	0,020	-0,108	0,583	-0,359	0,001	0,226	0,311
PCR X FE	-0,163	0,260	-0,215	0,270	-0,445	0,001	-0,432	0,019
PCR X TIBC	-0,423	0,002	0,119	0,544	-0,415	0,001	-0,211	0,270

r: coeficiente de Spearman. Os valores significativos estão representados em negrito.

Hb=Hemoglobina, EPO=Eritropoetina, PCR=Proteína C Reativa, VHS=velocidade de Hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1 β =Interleucina 1 beta, TNF α =Fator de necrose Tumoral alfa, Neop=Neopterina, Pró-Hep = Pró- hepcidina.

4.4.3- Correlação entre os níveis de Hemoglobina e Eritropoetina

Com o objetivo de avaliarmos a resposta da EPO à anemia correlacionamos os níveis de Hb com os níveis de EPO nos diversos grupos de pacientes. O único grupo entre os anêmicos que mostrou correlação significativa, embora fraca, foi o de pacientes com AF (r= -0.058, p=0.009).

Curiosamente uma correlação inversa moderada foi observada no grupo sem anemia (r= -0.545, p= 0.002). A Figura 14 ilustra essa correlação.

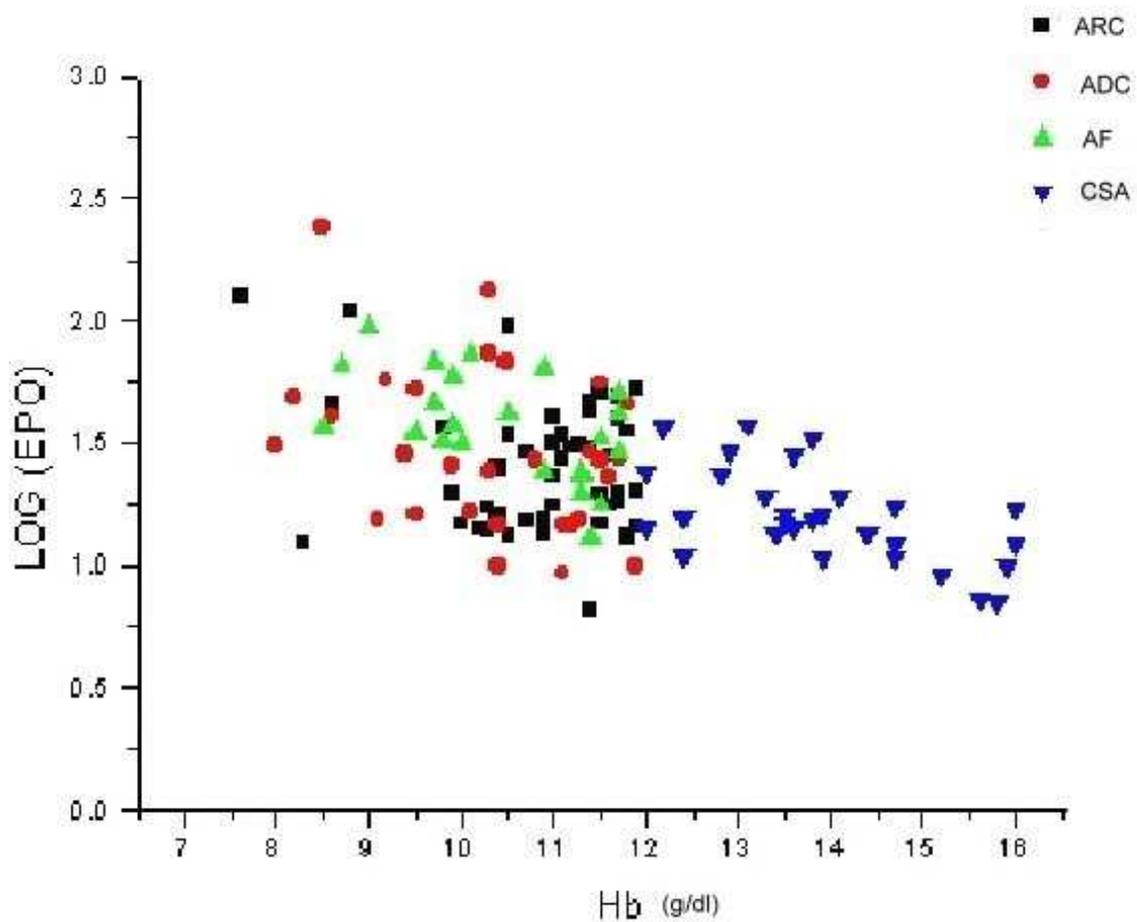


Figura 14- Correlação entre níveis de Hb e log EPO nos vários grupos estudados.

LOG= logaritmo, EPO= Eritropoetina, Hb = Hemoglobina, ARC= Anemia Relacionada ao Câncer, ADC =Anemia de Doença Crônica, AF= Anemia Ferropriva, CSA = Câncer sem anemia.

4.5- Avaliação dos parâmetros laboratoriais na diferenciação entre ADC e AF em pacientes com câncer

Para verificarmos qual o melhor parâmetro para distinção entre AF e ADC, estabelecemos a sensibilidade e a especificidade de cada exame laboratorial por meio da análise da curva ROC.

Os resultados mostraram que o melhor parâmetro para a distinção entre AF e ADC foi o índice sTfR/log FTNA, apresentando uma sensibilidade de 93,1%, com especificidade de 95,5%. (Figura 15). Outros parâmetros que apresentaram resultados interessantes foram a TIBC, com sensibilidade de 69,0% e especificidade de 100,0% (Figura 16) e a PCR com sensibilidade de 82,1% e especificidade de 81,0% (Figura 17). Os valores referentes às curvas ROC estão apresentadas em forma de tabela em anexos.

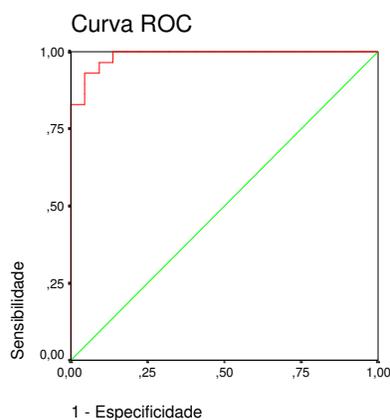


Figura 15- Curva ROC para sTfR/log FTNA (ADC e AF)

AUC = 0.987 ± 0.011 ; I.C. 95% (0,966- 1,000); p-valor = 0,001,
Ponto de corte $\leq 0,9845$, Sensibilidade = 93.1%, Especificidade = 95,5%

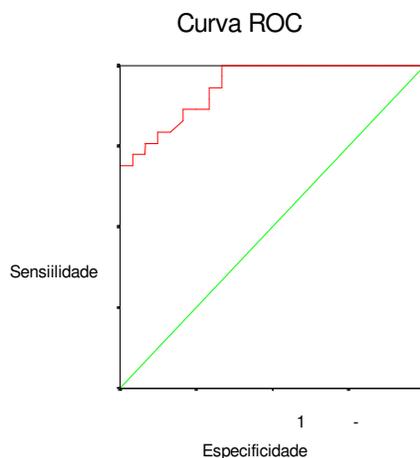


Figura 16- Curva ROC para TIBC (ADC e AF)

AUC = $0,935 \pm 0,030$; I.C. 95% (0,875- 0,994); p-valor = 0,001

Ponto de corte ≤ 260 , Sensibilidade = 69,0%, Especificidade = 100,0%.

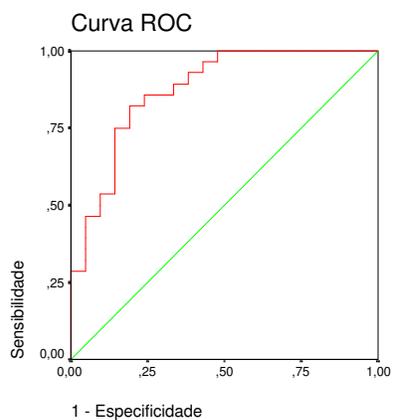


Figura 17- Curva ROC para PCR (ADC e AF)

AUC = $0,874 \pm 0,051$; I.C. 95% (0,774- 0,975); p-valor = 0,001

Ponto de corte $\geq 1,925$, Sensibilidade = 82,1%, Especificidade = 81,0%.

Conforme os dados obtidos a partir da curva ROC propomos um protocolo laboratorial para diferenciação da anemia em pacientes com câncer.

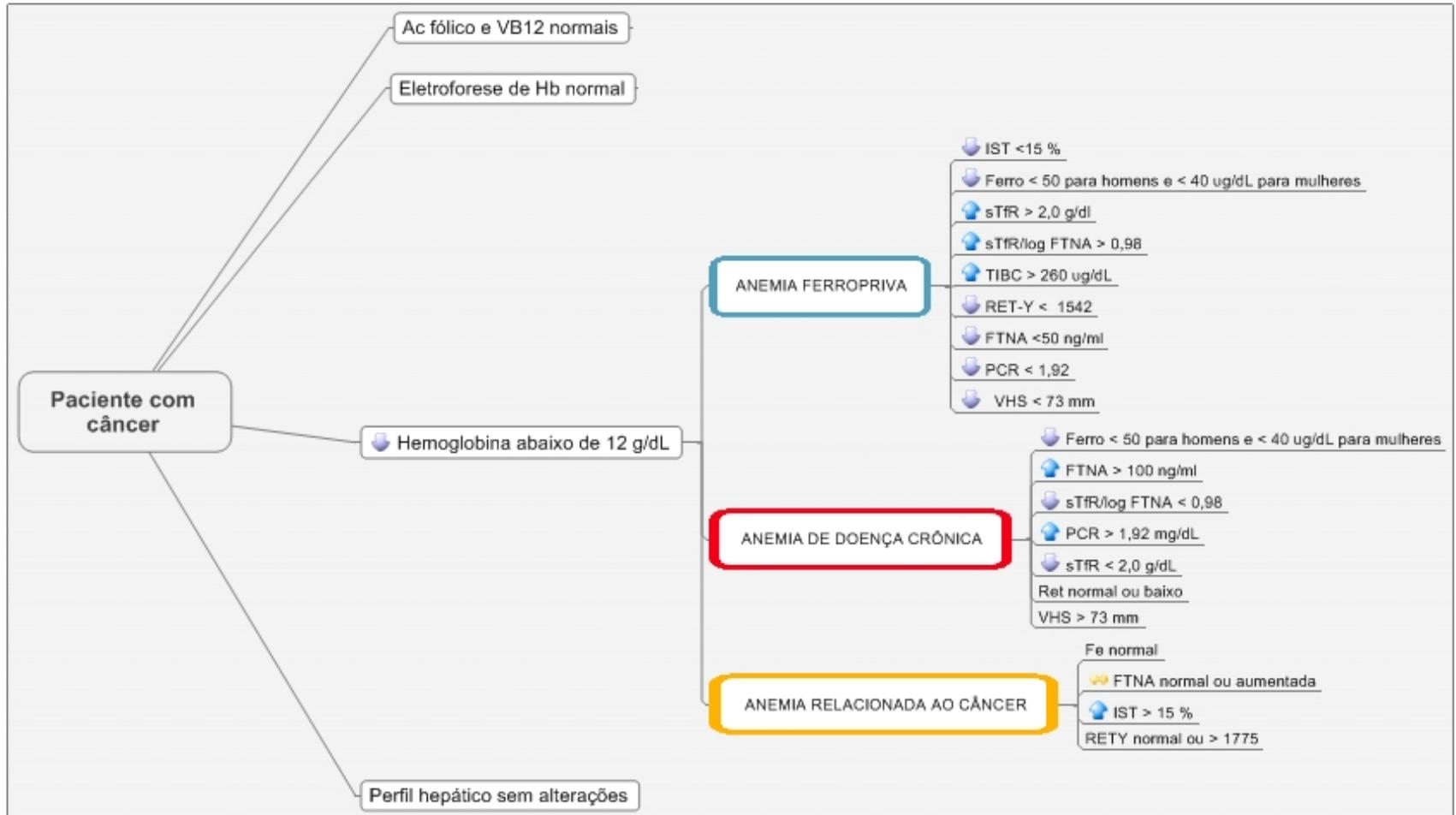


Figura 18- Protocolo proposto para diferenciação entre ADC, ARC e AF em pacientes com câncer

5- DISCUSSÃO

A associação entre anemia e inflamação tem sido exaustivamente investigada. Numerosos mecanismos estão envolvidos na patogênese da ADC e os estudos mais recentes têm mostrado um progresso crescente em seu entendimento.(Means, 2003).

A investigação da anemia em pacientes com câncer é particularmente desafiadora, uma vez que, além dos efeitos do processo inflamatório sobre a eritropoiese, adicionam-se outros relacionados à própria transformação maligna, peculiaridades relativas à localização do tumor e às repercussões conseqüentes aos diversos tratamentos. (Clarke e Pallister, 2005).

Como resultante temos a eritropoiese sofrendo numerosas interferências que culminam com um quadro de anemia cuja etiologia principal nem sempre é identificada. A própria definição do valor de Hb como indicativo de anemia em pacientes com câncer não é homogênea na literatura. Alguns autores recomendam valores de Hb inferiores a 12 g/dl em mulheres e inferiores a 13,0 g/dl em homens (Sweenwy et al, 1998). Outros sugerem Hb <12 g/dl para mulheres (Theurl et al 2006, Thomas e Thomas, 2005), e Hb <13.5 para homens ou Hb <11,5 g/dl para mulheres (Bokemeyer e Foubert, 2004). A Organização Mundial de Saúde define anemia como um Hb <10.9 g/dl (Groopman e Itri, 1999). Em nosso estudo adotamos o valor de hemoglobina abaixo de 12 g/dl como indicativo da presença de anemia (Theurl et al 2006, Thomas e Thomas 2005).

O próximo passo seria classificar a anemia para que alguns aspectos particulares relativos à participação de proteínas pró-inflamatórias pudessem ser investigados. Novamente deparou-se com a falta de consenso na literatura sobre quais parâmetros e quais valores de corte seriam considerados para sub-classificar diversos tipos de anemia. Alguns exemplos de critérios adotados para o diagnóstico de AF podem ser citados: VCM < 80 fl e FTNA < 15 µg/dl (Chua et al, 1999); ferro medular ausente acompanhado de microcitose (Kruiper-Kramer et al, 1997); FTNA < 14 µg/l para mulheres e < 39 µg/l para homens, IST < 20% (Nagral et al, 1999); Fe < 26 µg/dl para mulheres, < 76 µg/dl para homens e FTNA < 20 µg/l (Wians et al, 2001); IST < 10% e Hb < 11,0 g/dl (Ullrich et al, 2005); FTNA < 12 µg/l para mulheres, e < 50 µg/dl para homens e Hb < 12,0 g/dl (Choi e Pai, 2003). A mesma falta de consenso é observada no diagnóstico de ADC: VCM > 80 fl, CRP > 5,0 mg/l e FTNA normal ou elevada (Chua et al, 1999);

presença de ferro nos macrófagos e ausência nos eritroblastos medulares (Kuiper-Kramer et al, 1997); FTNA > 240 µg/l para mulheres e > 375 µg/l para homens (Wians et al, 2001); reduções nos valores de Fe e TIBC, FTNA normal ou elevada e sTfR normal ou levemente elevado (Opasich et al, 2005), entre outros.

Para adotar-se critérios para o diagnóstico das anemias partiu-se do conhecimento da fisiopatogenia das anemias, ou seja, pacientes deficientes de ferro deveriam apresentar alterações laboratoriais condizentes com redução do ferro funcional (redução nos níveis de Hb, Fe e IST) e do ferro de estoque (redução da FTNA), e pacientes com ADC deveriam apresentar ferropenia e estoque de ferro normal ou elevado, representado pelos níveis de FTNA.

Num terceiro grupo (ARC) foram alocados os pacientes que tinham anemia mas não apresentavam ferropenia, condição necessária para serem classificados como AF ou ADC, e cujas características clínicas e laboratoriais não sugeriam outros tipos de anemias carenciais ou hemólise/hemorragia.

O termo “anemia relacionada ao câncer” foi utilizado por Clarke e Pallister (2005) que o definiram como uma forma de ADC específica para pacientes com câncer e secundária à ativação da resposta imune e inflamatória induzida pelo próprio tumor. Adotou-se esse termo para um sub-grupo de anemia onde provavelmente a resposta inflamatória tem efetiva participação na anemia, mas sem um reflexo aparente sobre o ferro circulante, já que os níveis de ferro sérico estavam acima do valor mínimo normal.

A partir do estabelecimento desses critérios respondeu-se aos dois primeiros objetivos desse estudo: avaliar o perfil hematológico de um grupo de pacientes com câncer e classificar a anemia. Assim, os resultados mostraram que cerca de 35% dos pacientes estudados apresentavam anemia, frequência menor do que a descrita por Bron et al em 2001. Como o grupo era bastante heterogêneo, abrangendo diversas localizações dos tumores em diferentes fases e tipos de tratamento, é provável que essa frequência tenha sido diluída pela presença de condições patológicas que exercem menor interferência na eritropoiese. A frequência da anemia observada nesse estudo foi semelhante ao do “European Cancer Anemia Survey” em que 15.367 pacientes foram analisados em

24 países da Europa e foram diagnosticados 39,3% de pacientes com diversos tipos de câncer e anemia (Ludwig et al, 2004).

Quanto ao tipo de anemia, a mais frequente foi a ARC, seguida da ADC e finalmente pela AF, onde mais de 40% dos casos correspondia a câncer de intestino e cerca de 30% de câncer gástrico, o que era esperado. A menor prevalência de AF ressalta a importância de um diagnóstico laboratorial preciso. O uso indiscriminado da reposição de ferro sem que o diagnóstico de AF tenha sido definido ainda é bastante difundido. Para os pacientes com câncer e anemia a reposição desnecessária do ferro, além de não reverter a anemia, pode retardar a instituição de um tratamento mais eficaz, como o uso de EPO recombinante, que tem mostrado resultados positivos com respeito à maior sobrevivência dos pacientes (Littlewood , 2001, Leyland Jones e O'shaughnessy ,2003).

Uma característica comum aos três tipos de anemia foi o caráter hipoproliferativo das mesmas, representado por contagens normais ou baixas de RET e ausência da correlação inversa entre níveis de Hb e número de RET, característico das anemias hemolíticas e hemorrágicas que cursam com medula óssea regenerativa.

A resposta da EPO à anemia também foi bastante insipiente. Os níveis elevados de EPO nos grupos anêmicos em relação ao CSA aparentemente foram insuficientes para estimular adequadamente a eritropoiese. Na AF a correlação Hb X EPO foi significativa, porém fraca, assim como o grupo com AF mostrou valores mais elevados de EPO quando comparados com ARC, sugerindo uma tentativa de resposta da EPO à anemia na deficiência de ferro. O gráfico em que valores de log de FTNA são correlacionados com os valores de Hb tem sido bastante utilizado para ilustrar a resposta da eritropoiese à EPO em diversos tipos de anemia (Roque et al, 2001), justamente por representar a cinética de resposta da EPO à anemia. Normalmente o nível sérico da EPO é relativamente baixo (5-30 mIU/ml) e, em condições fisiológicas quando ocorre o declínio linear nos valores de Ht ou Hb, é observada uma elevação exponencial da EPO sérica a partir de valores de Hb < 10-11 g/dl) (European School of Haematology -ESH, 2006).

Já foi demonstrado que a resposta à anemia está prejudicada em diversas doenças malignas (Béguin et al, 1992; Corazza et al, 1998; Ozguroglu et al, 2000), provavelmente como resultado dos efeitos supressivos da Neop, TNF e IL-1 sobre as

células produtoras de EPO. Foi mostrado *in vitro* que a IL-1 e o TNF- α inibem diretamente a expressão do gene da EPO e do seu receptor, diminuindo assim a proliferação eritróide e aumentando a apoptose (Frede et al 1997;ESH, 2006). A ação inibitória das citocinas inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TGF- β e TNF- α sobre a produção de EPO induzida por hipóxia foi demonstrada em células Hep3B provavelmente por um efeito direto na transcrição da EPO ou na estabilidade do seu RNAm (Faquin et al ,1992).

Em um estudo com crianças com câncer e anemia foi observada uma correlação moderada entre Hb e EPO, mas não entre TNF- α ou VHS, usados como índices inflamatórios, e níveis de Hb, EPO ou sTfR. Os autores sugerem que em crianças com câncer a produção de EPO não está alterada e que a inflamação crônica não tem efeito inibitório sobre a eritropoiese (Kim et al, 2002). No nosso estudo a ação inibitória das citocinas sobre a EPO foi observada apenas no grupo com ADC, por meio das correlações entre EPO x IL-6 e EPO x VHS.

A diversidade de dados a esse respeito sugerem que os níveis de EPO podem variar de acordo com a doença de base e podem depender de outros fatores como infiltração medular, disponibilidade de ferro e capacidade proliferativa das células eritróides. A resposta a EPO também pode estar relacionada a gravidade da doença e à concentração de citocinas circulantes. Nesse sentido foi demonstrado que na presença de concentrações aumentadas de TNF e IFN- γ são necessárias maiores concentrações de EPO para restaurar as UFC-E (Means,1990). Além disso, a resposta a EPO é altamente dependente de suprimento adequado de ferro para a proliferação e síntese de Hb, uma condição que geralmente está prejudicada em pacientes com ADC (Rodriguez, 2001).

A participação da atividade inflamatória sobre a eritropoiese e metabolismo do ferro, um dos objetivos do nosso estudo, mostrou resultados interessantes. Foram observados níveis de PCR, VHS, IL-6 e IL-1 β mais elevados no grupo de pacientes com ADC do que nos demais tipos de anemia e mesmo no grupo sem anemia. Como usamos como critério principal para a identificação do grupo com ADC a ferropenia com valores de FTNA normais ou elevados, seria esperado um provável efeito desses marcadores inflamatórios sobre o metabolismo do ferro, o que não foi observado. Uma das vias de indução da hipoferremia da inflamação é por meio da IL-6 induzindo a síntese de

hepcidina, hormônio regulador do ferro. A descoberta desse peptídeo produzido pelo fígado e sua ação inibitória na absorção intestinal do ferro e na liberação do ferro do SRE trouxe algumas respostas importantes para o entendimento da fisiopatogenia da ADC (Nemeth et al, 2004), o que tem colocado esse hormônio como mediador central da anemia da inflamação.

Já foi demonstrado que a IL-6 regula a expressão da hepcidina por meio da ligação direta do STAT3 hepático ao gene promotor (Wrighting e Andrews, 2006). Outro regulador positivo da produção hepática de hepcidina seria a sobrecarga de ferro, enquanto a hipóxia e a anemia resultariam numa diminuição da sua síntese (revisado em Donovan et al, 2006). O mecanismo pelo qual a hepcidina regula a exportação do ferro nos enterócitos e macrófagos também já foi descrito e consiste na ligação da hepcidina com a ferroportina e na indução de sua degradação nos lisossomas (Nemeth et al, 2004).

Assim, a possibilidade de se quantificar a hepcidina no soro dos pacientes seria uma boa ferramenta para investigar aspectos relacionados à anemia e os distúrbios do metabolismo do ferro principalmente nas anemias que acompanham os quadros inflamatórios.

Recentemente foi disponibilizado no mercado um ensaio enzimático que propõe quantificar a Pró-Hep, constituída de 60 aa (aa 25-84) e que corresponde à forma resultante da clivagem do precursor da hepcidina. O teste de ELISA usa anticorpo de coelho policlonal contra a região N-terminal (aa 28-47) da Pró-Hep (Kulaksiz et al ,2004). Alguns estudos usando esse ensaio têm mostrado resultados intrigantes. Os níveis de Pró-Hep no soro foram significativamente mais baixos em pacientes com hemocromatose hereditária do que em pacientes controle, e significativamente maiores em pacientes com insuficiência renal crônica, mas não foi observada correlação entre Pró-Hep e ferro, FTNA ou IST (Kulaksiz et al , 2004). A relação entre Pró-Hep, função renal e estado do ferro foi estudada em pacientes em hemodiálise e em receptores de transplante renal. Foi observada uma correlação entre hepcidina e função renal, mas não entre hepcidina e os parâmetros relativos ao estado do ferro. Os autores sugerem um possível papel do rim e da função renal sobre o metabolismo do ferro (Malyszko et al, 2006). Kulaksiz et al (2004) anteriormente

sugeriram que os rins, além do fígado, estaria envolvido não somente na síntese, mas também na eliminação da hepcidina.

A concentração de Pró-Hep no plasma foi avaliada em pacientes com anemia falciforme e não foi observada diferença entre os controles saudáveis e os pacientes com anemia falciforme, independente de estarem na fase estável da doença ou em condições relacionadas a complicações provocadas por infecções (Ezeh et al, 2005).

Recentemente foi investigada a possível participação da hepcidina como marcador inflamatório na aterosclerose. Níveis mais elevados de pro-hep foram encontrados em pacientes com artrite reumatóide do que nos controles, enquanto o grupo com aterosclerose mostrou valores similares ao grupo controle normal. Os autores argumentam que provavelmente o processo inflamatório que acompanha a aterosclerose é menos grave do que o da artrite reumatóide e que possivelmente a excreção urinária da hepcidina poderia ser detectada nos processos inflamatórios de baixo grau ou sub-clínicos, como o da aterosclerose (Oguz et al, 2006).

Até o momento não tem-se conhecimento sobre outros estudos em que tenha sido avaliada a determinação de Pró-Hep em pacientes com câncer. Os resultados obtidos foram aquém das nossas expectativas, já que não foi observada diferença nos níveis de Pró-Hep entre grupos anêmicos, entre pacientes com e sem anemia, e mesmo quando os pacientes com câncer foram comparados a um grupo de indivíduos saudáveis (dados não mostrados). Diferentemente de outros marcadores inflamatórios, a Pró-Hep não se correlacionou com a gravidade da anemia nem com os marcadores do metabolismo do ferro. Embora a IL-6 seja o principal indutor da hepcidina e o possível efeito inibitório da IL-6 na eritropoiese tenha sido demonstrado no grupo com ADC, não foi observada correlação entre IL-6 e Pró-Hep

Dallalio et al (2003) dosaram a hepcidina no soro por meio da técnica de Western-Blott e não observaram correlação entre a hepcidina e marcadores do metabolismo do ferro, com exceção das concentrações de FTNA. Sugeriram que a hepcidina estaria primariamente associada com a regulação da produção de FTNA, e em menor escala um real mediador da ACD. Esses resultados estão em concordância com os

aqui descritos, já que houve uma correlação significativa entre pro-hepc e FTNA no grupo com ADC.

O real valor das determinações de Pró-Hep séricas tem sido motivo de vários questionamentos, uma vez que a forma madura da hepcidina é a única conhecida como biologicamente ativa. A detecção e quantificação da hepcidina no plasma ou urina tem esbarrado em dificuldades técnicas, como o tamanho muito pequeno do peptídeo (20, 22 e 25 aminoácidos), disponibilidade limitada do antígeno e o isolamento da hepcidina da urina que é bastante demorado (Malyszko et al, 2006). Por outro lado a determinação da pro-hepc que tem 60 aminoácidos é passível de ser medida, mas a porção N terminal do anticorpo utilizada pode representar aminoácidos precursores não funcionais e não a molécula ativa. (Brookes et al,2005). A determinação de hepcidina urinária poderia ser uma medida mais precisa devido às características do peptídeo: uma molécula de baixo peso molecular poderia ser retirada mais rapidamente da circulação e provavelmente poderia corresponder a uma “forma livre” de hepcidina, ao contrário do forma detectada pelo Ac utilizado nas análises do soro (Means,2004). Ambas as explicações são plausíveis, embora não esclareçam os nossos resultados.

Analisou-se também os níveis de Neop, produto dos macrófagos estimulados pelo IFN- γ , cuja determinação pode estimar a extensão do stress oxidativo e a ativação do sistema imune (Murr et al ,2002). Tem a vantagem de ser um elemento mais estável do que o IFN- γ quando na circulação, facilitando sua determinação (Fuchs et al,1991). Níveis elevados de Neop foram descritos em pacientes com doenças infecciosas (Fuchs et al, 1993; Denz et al, 1992; Grotto et al, 1994), doenças auto-imunes (Samsonov et al 1995; Samsonov et al ,1997; Reibnegger et al 1986a; Reibnegger et al,1986c), em doenças neurodegenerativas (Leblhuber et al, 1999), assim como em doenças cardiovasculares, como aterosclerose (Ridker et al, 2000), cardiomiopatia e miocardite crônica (Samsonov et al, 1992).Recentemente foi relatado que valores séricos de Neop eram significativamente mais elevados nos pacientes com doenças falciformes do que nos controles, provavelmente devido à presença de processos de microobstruções crônicas presentes mesmo durante a fase “estável” da doença (Rodrigues et al ,2006).

Em doenças tumorais malignas a elevação dos níveis de Neop depende do tipo de tumor, estando elevados em cerca de 90% das neoplasias hematológicas e em 20% dos tumores de mama e melanoma (Reibnegger et al,1986b, Reibnegger et al,1991).Frequências intermediárias de altas concentrações de Neop foram observados em câncer de ovário (80%) e de pulmão (cerca de 58%) (revisado por Murr et al, 2002).Outro fator que interfere no grau de elevação dos níveis de Neop seria o estágio do tumor (Wachter et al, 1989) e a agressividade do tumor, o que confere um valor prognóstico à Neop, já que respostas celulares mais intensas contra tumores mais agressivos levariam a níveis mais elevados de Neop (Murr et al ,2002).

Nos processos vasculares, níveis elevados de Neop além de sugestivos da ativação dos macrófagos, seriam indicativos da atividade inflamatória crônica (Schumacher et al, 1997; Anwaar et al, 1999).

No grupo de pacientes com câncer que estudamos foi observado que todos os grupos apresentaram níveis de Neop sérica mais elevados do que um grupo de indivíduos normais. Entre os pacientes com câncer, a mediana mais elevada foi encontrada no grupo com ADC, mas só alcançou diferença significativa com o grupo com AF. Esses dados corroboram os da literatura e reforçam o papel da Neop como um marcador da ativação do sistema imune e da participação da resposta do sistema monócito/macrófago contra células tumorais (Murr et al, 2002). Vale lembrar que outros fatores podem estar colaborando para a elevação dos níveis de Neop nesses pacientes, já que outras citocinas são capazes de induzir a liberação de INF- γ por células T e, conseqüentemente, aumentar a liberação de Neop, como IL-2, TNF- α e GM-CSF (Brown et al, 1989; Marth et al, 1994).

A correlação entre Neop e a eritropoiese nos pacientes com câncer não foi por nós demonstrada, diferentemente do relatado em outras doenças crônicas, como infecção pelo HIV (Fuchs et al, 1991), artrite reumatóide (Reibnegger et al, 1986a) e neoplasias hematológicas (Denz et al, 1990). Da mesma forma a ação da Neop sobre o metabolismo do ferro demonstrada em doenças inflamatórias crônicas (Fuchs et al, 1991; Weiss et al, 1988), não foi observada nas neoplasias malignas.

Finalmente, foi objetivo desse trabalho avaliar a eficiência de diferentes parâmetros laboratoriais na difícil diferenciação entre AF e ADC. Numerosos estudos têm se dedicado a esse tema. Entre os diversos parâmetros, a determinação sérica do receptor da transferrina tem se mostrado ser a mais eficiente (Markovic et al, 2005, Remacha et al 1998, Wians et al, 2001, Margetic et al, 2005, Hanif et al, 2005). No nosso estudo o sTfR mostrou uma sensibilidade moderada (69%) e boa especificidade (82.6%) para distinguir ADC da AF. Quando foi associado ao log da FTNA, entretanto, esse resultado foi visivelmente melhor (sensibilidade 93.1% e especificidade 95.5%). Esses dados confirmam os da literatura, em que a combinação de um parâmetro que mede o ferro funcional (sTfR) com um outro que se refere ao ferro de estoque (FTNA) parece ser mais eficaz do que quando utilizados separadamente (De Caterina et al, 2005; Margetic et al 2005).

A concentração do sTfR aumenta progressivamente numa proporção inversa à magnitude da deficiência de ferro, já que as células regulam a expressão do receptor de acordo com a necessidade de ferro das células (Skikne et al ,1990).

Entretanto o sTfR também reflete a atividade eritropoiética. Assim, provavelmente os níveis de sTfR que foram encontrados nos nossos pacientes com AF não foram tão elevados como era esperado porque outros interferentes, principalmente o uso de drogas citostáticas, de alguma maneira devem interferir na atividade medular, prejudicando a expressão desses receptores nas células eritropoiéticas.

Por outro lado, anemias com atividade eritropoiética elevada como as anemias hemolíticas são acompanhadas por níveis elevados de sTfR. No grupo com ARC oito dos 52 pacientes apresentaram valores superiores ao limite normal ($> 2,38$ mg/l). Desses oito pacientes, dois apresentaram VCM > 100 fL, mas contagem de reticulócitos normal ($69,9$ e $35,1 \times 10^9/\mu\text{l}$), o que praticamente afasta a possibilidade da coexistência de um processo hemolítico.

Um outro parâmetro analisado que apresentou ótima especificidade (100 %) e moderada sensibilidade (69 %) para diferenciar AF de ADC foi o TIBC. Tem como maiores vantagens a facilidade de obtenção e o baixo custo. Valores menores do que

260 µg/dl afastam a possibilidade do paciente ter AF. Entretanto, valores acima de 260 µg/dl podem ser encontrados nos pacientes com ADC (8/29). Entre esses oito, somente um apresentava também níveis de sTfR sugestivos de AF associada. Portanto, esse parâmetro não auxilia na identificação da AF +ADC.

Markovic et al (2005) estudaram e analisaram a utilização do sTfR e do índice sTfR /log FTNA na identificação dos pacientes com AF, ADC e AF+ADC. Usaram como critério para classificar os pacientes com a associação AF+ADC a presença simultânea de sangramento e tumor sólido gastrointestinal. Os pacientes com AF eram os que apresentavam apenas sangramento e os com ADC aqueles com neoplasias ou doença inflamatória sem sangramento. Observaram que no grupo com AF+ADC, os valores do sTfR e do índice sTfR /log FTNA eram mais elevados do que no grupo com ADC, mas menores do que no grupo com AF. Determinaram como valor de corte para o sTfR < 2,07 mg/dl e < 0,90 para o índice sTfR /log FTNA para diferenciar ADC de AF e AF+ADC. Adotamos esses valores para identificar possíveis pacientes com ADC+AF e observamos que oito dos 29 apresentaram valores de sTfR > 2,07 mg/l e desses nove, seis apresentaram, concomitantemente valores de sTfR /log FTNA < 0,90, sugerindo a associação dos dois tipos de anemia. Nesses pacientes seria interessante uma investigação clínica mais detalhada, investigando inclusive a presença de sangramento oculto.

Os marcadores inflamatórios PCR e VHS mostraram boa sensibilidade (82,1% e 95,8%, respectivamente) para indicar pacientes com ADC, embora a especificidade não tenha tido o mesmo desempenho (81 % para PCR e 65% para o VHS). De qualquer modo, por tratarem-se de parâmetros laboratoriais rotineiros, em especial o VHS, podem ser auxiliares no diagnóstico de ADC. Assim, pacientes com anemia e VHS > 73 mm (1ª hora) merecem uma investigação adicional da presença de ADC.

6- CONCLUSÃO

Podemos concluir que:

Cerca de 1/3 da população de pacientes com câncer estudada apresentou anemia e que a forma mais freqüente de anemia foi a ARC, seguida da ADC e finalmente da AF. O diagnóstico diferencial entre os diversos tipos de anemia foi bastante dificultado devido à possibilidade da coexistência de diversos fatores etiológicos.

O índice sTfR/log FTNA foi o melhor indicador na diferenciação entre ADC e AF em pacientes com câncer.

A atividade inflamatória foi mais evidente no grupo de pacientes com ADC.

O processo inflamatório mediado por proteínas pró-inflamatórias aparentemente exerce um efeito negativo sobre a eritropoiese e de maneira menos expressiva no metabolismo do ferro, contribuindo, assim, para o estabelecimento da ADC.

A Neopterina, produto dos macrófagos estimulados pelo IFN- γ , cuja determinação pode estimar a extensão do stress oxidativo e a ativação do sistema imune, mostrou níveis elevados em todos os grupos de pacientes com câncer.

Não foi possível demonstrar a participação da hepcidina na anemia de pacientes com câncer utilizando a metodologia por nós empregada. Entretanto, como não pode ser descartada a possibilidade de uma limitação técnica do ensaio, é prematura uma conclusão a respeito e novos estudos são necessários para um melhor entendimento.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and Molecular Immunology. 3ed Philadelphia:1997.p.250-276.

Abshire, TC. The anemia of inflammation. Ped Clin of North Am 1996;43:623- 637.

Alfrey CP, Rice L, Udden NM, Driscoll TB. Neocytolysis: physiological down-regulation of red-cell mass.Lancet 1997;349:1389-1390.

Andrews N. Anemia of inflammation: the cytokine-hepcidin link. J Clin Invest 2004; 113:1251-1253.

Anwaar I, Gottsater A, Lindgarde F, Mattiasson I. Increasing plasma neopterin and persistent plasma endothelin during follow-up after acute cerebral ischemia.Angiology. 1999 ;50(1):1-8.

Aulitzky W, Frick J, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G & Wachter H. Significance of urinary neopterin in patients with malignant tumors of the genitourinary tract. Cancer 1985; 55:1052–1055.

Bain,B. Células Sangüíneas.2.ed. Porto Alegre:Artes Médicas,1997.p.177.

Barak M, Gruener N .Neopterin augmentation of tumor necrosis factor production. Immunol Lett 1991; 30:101–106.

Barrett-Lee PJ,Bailey NP,O'Brien ME,Wager E.Large-scale UK audit of blood transfusion requirements and anaemia in patients receiving cytotoxic chemotherapy. Brit J of Cancer 2000;82:93-97.

Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today 1994; 15(2):74-80.

Beguin Y. The soluble transferrin receptor: biological aspects and clinical usefulness as quantitative measure of erythropoiesis. Hematol 1992;77:101.

Boelaert JR Altered Iron metabolism in HIV infection: mechanisms,possible consequences and proposals for management. Infect Diseases and Agents 1996;5:36-46.

Bokemeyer C, Foubert J. Anemia impact and management: focus on patients needs and the use of erythropietic agents. Semin Oncol 2004; 31: 4-11.

Bokemeyer C, Ludwig H. ESO Scientifics Updates 2001;6. Anaemia in Cancer. Elsevier Science BV.

Brizel DM, Scully SP, Harrelson JM, Layfield LJ, Bean JM, Prosnitz LR, Dewhirst MW. Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma. *Cancer Res* 1996 ;56:941-3.

Brock JH. Iron in infection, immunity, inflammation and neoplasia, in *Iron Metabolism in Health and Disease*. Edited by Brock JH, Halliday JW, Pippard MJ, Powell LW, London, WB Saunders Company Ltd, 1994:353-89.

Bron D, Meleuman N, Mascaux C. Biological Basis of Anemia. *Semin Oncol* 2001; 28:1-6.

Brookes MJ, Sharma NK, Tselepis C, Iqbal TH. Serum pro-hepcidin: measuring active Hecpidin or a non-functional precursor? *Gut* 2005; 54: 169-170.

Brown RR, Lee CM, Kohler PC, Hank JA, Storer BE, Sondel PM. Altered tryptophan and neopterin metabolism in cancer patients treated with recombinant interleukin 2. *Cancer Res* 1989; 49:4941-4.

Byrd T, Horwitz, MA. Regulation of transferrin receptor expression and ferritin content in human mononuclear macrophages. Coordinate upregulation by iron transferring and downregulation by interferon gamma. *J Clin Invest* 1993;91:969-976.

Cabanillas F, Burke JS, Smith TL, Moon TE, Butler J J, Rodriguez V. Factors predicting for response and survival in adults with advanced non-Hodgkins lymphoma. *Arch Intern Med* 1978;138:413-418.

Cartwright GE, Wintrobe M.M. The anemia of infection. XVII. A review, *Adv Intern Med* 1952; 5:165-226.

Cartwright, G.E., Lee, G.R. The anaemia of chronic disorders, *Br J Haematol.* 1971; 21:147-152.

Cella D. The functional Assessment of cancer therapy-anemia (FACT-An) scale: A new tool for the assessment of outcomes in cancer anemia and fatigue. *Semin in Hematol* 1997; 34: 13-19.

Choi JW, Pai SH. Associations between serum transferrin receptor concentrations and erythropoietic activities according to body iron status. *Ann Clin Lab Sci.* 2003 33(3): 279-84.

Chua E, Clague JE, Sharma AK, Horan MA, Lombard M. Serum transferrin receptor assay in Iron deficiency anaemia and anaemia of chronic disease in the elderly. *QJ Med.* 1999;92:587-594.

Chung J, Wessling-Resnick M. Molecular mechanisms and regulation of iron transport. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2003;40(2):151-82.

Clarke H, Pallister CJ. The impact of anaemia on outcome in cancer. *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 1-13.

Clibon U, Bonewald L, Caro J, Roodman GD: Erythropoiesis fails to reverse the anemia in mice continuously exposed to tumor necrosis factor-alpha in vivo. *Exp Hematol* 1990; 18:438-442.

Coiffier B, Guastalla JP, Pujade-Lauraine E, Bastif P. Predicting cancer-associated anaemia in patients receiving non-platinum chemotherapy: results of a retrospective survey. *Eur J Cancer* 2001;37:1617-1623.

Conrad ME, Umbreit JN, Moore EG. Iron absorption and transport. *Am J Med Sci.* 1999; 318(4):213-29.

Corazza F, Beguin Y, Bergmann P, Andre M, Ferster A, Devalck C, Fondu P, Buyse M, Sariban E. Anemia in children with cancer is associated with decreased erythropoietic activity and not with inadequate erythropoietin production. *Blood* 1998 ;92:1793-8.

Dallalio G, Law E, Means Jr RT. Heparin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* 2006; 107: 2701-2704.

Dallalio G, Fleury T, Means Jr RT. Serum Heparin in clinical specimens. *Brit J Haematol* 2003; 122: 996-1000.

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1):60-8.

De Caterina M, Grimaldi E, Di Pascale G, Salerno G, Rosiello A, Passaretti M, Scopacasa F. The soluble transferrin receptor (sTfR)-ferritin index is a potential predictor of celiac disease in children with refractory iron deficiency anemia. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43(1):38-42.

Denz H, Huber P, Landmann R, Orth B, Wachter H, Fuchs D. Association between the activation of macrophages, changes of iron metabolism and the degree of anaemia in patients with malignant disorders. *Eur J Haematol.* 1992 ;48(5):244-8.

Denz, H., Fuchs, D., Huber, H., et al. Correlation between neopterin, interferon-gamma, and haemoglobin in patients with haematological disorders, *Eur J Haematol* 1990; 44: 186–189.

Détivaud L, Nemeth E, Boudjema K et al. Hepcidin levels in human are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood* 2005; 106: 756-748.

Domachowske, J.B. The role of nitric oxide in the regulation of cellular iron metabolism, *Biochem Mol Med* 1997; 60:1–7.

Donovan A, Roy CN, Andrews NC. The ins and outs of iron homeostasis. *J Appl Physiol.* 2006; 21:115-23.

Donovan A, Brownlie A, Zhou Y , Shepard J, Pratt SJ, Moynihan J et al. Positional cloning of zebrafish ferroportin 1 indentifies a conserved vertebrate iron exporter, *Nature* 2000;403:776-81.

European School Haematology -ESH – The Handbook 2006. Disorders of Iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis .Pathophysiology and differential diagnosis of anaemia. Jean François Lambert, Photis Beris. Forum services editors .Paris, 2006.

Ezeh C, Ugochukwu CC, Weinstein J, Okpala I. Heparin, haemoglobin and ferritin levels in sickle cell anaemia. *Eur J Haematol* 2005; 74: 86-8.

Fahmy M, Young SP. Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines: changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA. *Biochem J* 1993; 296: 175-81.

Faquin WC, Schneider TJ, Goldberg MA. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* 1992; 79: 1987-1994.

Ferguson BJ, Skikne BS, Simpson KM, Baynes RD, Cook JD. Serum transferrin receptor distinguishes the anemia of chronic disease from iron deficiency anemia. *J Lab Clin Med* 1992; 19: 385-390.

Fleming S. Nramp 2 is mutated in the anemic Belgrade (b) rat: evidence of a role for Nramp 2 in endosomal iron transport. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 1148-1153.

Frazer DM, Wilkins SJ, Becker EM, Vulpe CD, McKie AT, Trinder D, Anderson GJ. Heparin expression inversely correlates with the expression of duodenal iron transporters and iron absorption in rats. *Gastroenterology* 2002; 123: 835-844.

Frede S, Fandrey J, Pagel H, Hellwig T, Jelkmann W. Erythropoietin gene expression is suppressed after lipopolysaccharide or interleukin-1 beta injections in rats. *Am J Physiol*. 1997 Sep; 273: R1067-71.

Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G & Wachter H. The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectious, and malignant diseases. *Crit Rev Cl Lab Sci* 1992; 29: 307-341.

Fuchs D, Weiss G, Wachter H. Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *Int Arch Allergy Immunol*. 1993; 101(1): 1-6.

Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Werner-Felmayer G, Dierich MP, Wachter H. Immune activation and the anaemia associated with chronic inflammatory disorders. *Eur J Haematol*. 1991; 46(2): 65-70.

Furukawa T, Kohno H, Tokynaga R, Taketani S. Nitric oxide mediated inactivation of mammalian ferrochelatase in vivo and in vitro: Possible involvement of the iron –sulfur cluster of the enzyme. *Biochem J* 1995;310:533-538.

Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *Engl J Med* 1999;340(17):1376. *N Engl J Med* 1999; 340(6):448-54.

Ganz T, Nemeth E. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006; 290: G199–G203.

Ganz T. Hepcidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 171-182.

Ganz,T. Hepcidin, a Key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003;102:183-188

Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. *Int J Biochem Cell Biol*. 2002 ;34(4):309-14.

Graziadei I ,Gaggi S, Kasebacher R, Braunsteiner H, Vogel W: . The hepatic acute phase proteins alpha 1 antitrypsin and alpha 2 macroglobulin inhibit binding of transferrin to its receptor. *Biochem J* 1993;290:109.

Graziadei I ,Gaggi S, Kasebacher R, Braunsteiner H, Vogel W: The acute phase Protein alpha 1 antitrypsin inhibits growth and Proliferation of human early erythroid progenitor cells(Burst-Forming Units Erythroid) and of human Erythroleukemic Cells(K562) in vitro by Interfering with transferrin Iron uptake. *Blood* 1994.;83:260-268.

Groopman JE, Itri LM. Chemotherapy-induced anemia in adults: incidence and treatment. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1616-1634.

Grotto HZW, Costa FF, Carneiro MV, Galiza Neto GC. Serum neopterin in patients with Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994 ;88(1):75.

Gunshin H, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Hediger M. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 1997;388:482-488.

Gupta A D, Abbi A. High serum transferrin receptor level in anemia of chronic disorders indicates coexistent iron deficiency. *Am J Hematol* 2003;72: 158-161.

Hamerlinck FF .Neopterin: a review. *Exp Dermatol* 1999;8:167–176.

Hanif E, Ayub M, Anwar M, Ali W, Bashir M.Evaluation of serum transferrin receptor concentration in diagnosing and differentiating iron deficiency anaemia from anaemia of chronic disorders.*J Pak Med Assoc* 2005; 55 (1):13-6.

Harrison L, Shasha D, Shiao L, White C, Ramdeen B, Portenoy R. Prevalence of anemia in cancer patients undergoing radiation therapy. *Semin Oncol* 2001; 28: 54-59.

Harper P, Littlewood T. Anaemia of cancer: impact on patient fatigue and long-term outcome.*Oncology*. 2005;69:2-7.

Hastka J, Lassere JJ, Schwarabeck A, Strauch M, Hehlmann R. Zinc protoporphirin in anemia of chronic disorders. *Blood* 1993;81:1200-1204.

Hausen A, Fuchs D, Grunewald K, Huber H, Konig K & Wachter H .Urinary neopterin in the assessment of lymphoid and myeloid câncer, and neopterin levels in haemolytic anaemia and benign monoclonal gammopathy. *Clin Biochem* 1982;15:34–37.

Hirst DG.Anemia: a problem or an opportunity in radiotherapy?Int J of Rad on Oncology Biol Phys 1986;12:2009-2017.

Hoffbrand AV, Pettit JE.Essential Hematology. 3rd edition, London, Edinburg, Boston, Blackwell Scientific publications,1995.

Hogarth MB, Gallimore R, Savage P, Palmer AJ, Starr JM, Bulpitt CJ, Pepys MB. Acute phase proteins, C-reactive protein and serum amyloid A protein, as prognostic markers in the elderly inpatient. *Age Ageing* 1997; 26(2):153-8.

Hunter HN, Fulton DB,Ganz T,Vogel HJ.The solution structure of human hepcidin ,a peptide hormone with antimicrobial activity that is involved in iron uptake na hereditary hemochromatosis.*J Biol Chem* 2002;277:37597-603.

Iwagaki H, Hizuta A, Tanaka N & Orita K .Decreased serum tryptophan in patients with cancer cachexia correlates with increased serum neopterin. *Immunol Invest* 1995; 24: 467–478.

Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production , *J Interferon Cytokine Res* 1998;18:555-559.

Johnson CS, Cook CA, Furmanski P: In vivo suppression of erythropoiesis by tumor necrosis factor- α (TNF- α): Reversal with exogenous erythropoietin (Epo). *Exp Hematol* 1990; 18: 109.

Kelleher DK, Matthiensen U, Thews O, Vaupel P. Blood flow, oxygenation and bioenergetic status of tumors after erythropoietin treatment in normal and anemic rats. *Cancer Res* 1996;56:4728-4734.

Kim M, Lee J,WU C, Cho S, Lee K .Defective Erythropoiesis in Bone Marrow is a Mechanism of Anemia in Children with Cancer. *J Korean Med Sci* 2002.;17:337-340.

Kitagawa S al.Activation of human monocyte functions by tumor necrosis factor :Rapid priming for enhanced release of superoxide and erythrophagocytosis ,but no direct triggering of superoxide release. *Exp Hematol* 1996;24:559-567.

Kuiper-Kramer PA, Huisman CM, Van der Molen-Sinke J, Abbes A, Van Eijk HG. The expression of transferrin receptors on erythroblasts in anaemia of chronic disease, myelodysplastic syndromes and iron deficiency.*Acta Haematol.* 1997;97(3):127-31.

Kulaksiz H, Gehrke SG, Janetzko A et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localisation in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 2004; 53: 735-743.

Kushner BH, Heller G, Cheung NK, Wollner N, Kramer K, Bajorin D, Polyak T, Meyers PA. High risk of leukemia after short-term dose-intensive chemotherapy in young patients with solid tumors.*J Clin Oncol.* 1998;16(9):3016-20.

Leblhuber F, Walli J, Demel U, Tilz GP, Widner B, Fuchs D. Increased serum neopterin concentrations in patients with Alzheimer's disease. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:429-31.

Leyland-Jones B, O'shaughnessy JA. Erythropoietin as a critical component of breast cancer therapy: survival, synergistic, and cognitive applications. *Semin Oncol*. 2003 30: 174-84.

Lewenhaupt A, Ekman P, Eneroth P, Eriksson A, Nilsson B & Nordstrom L .Serum levels of neopterin as related to the prognosis of human prostatic carcinoma. *Eur Urolol* 1986; 12:422–425.

Lind M, Vernon C, Cruickshank D et al. The level of haemoglobin in anaemic cancer patients correlates positively with quality of life. *Brit J Cancer* 2002; 86: 1243-1249.

Littlewood ,TJ. The impact of hemoglobin Levels on Treatment Outcomes in Patients with Cancer. *Semin Oncol* 2001;28:49-53.

Locke, A., Main, E.R., Rosbach, D.O. The copper and non-hemoglobinous iron contents of the blood serum in disease. *J Clin Invest* 1932; 11:527-42.

Lucey DR, Clerici M & Shearer GM. Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiol Rev* 1996;9:532–62.

Ludwiczek S, Aigner E, Theurl et al. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood* 2003; 101: 4148-4154.

Ludwig H, Van Belle S, Barrett-Lee P, Birgegard G, Bokemeyer C, Gascon P, Kosmidis P et al. The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *Eur J Cancer* 2004; 40:2293-306.

Ludwig H, Fritz E. Anemia in cancer patients. *Semin Oncol* 1998;25 (07): 2-6.

Ludwiczek S, Aigner E, Theurl I, Weiss G. Cytokine-mediated regulation of iron transport in human monocytic cells. *Blood*. 2003 May 15;101(10):4148-54.

Mabbott N, Sternberg J. Bone marrow nitric oxide production and development of anemia in *Trypanosoma Brucei*-infected mice. *Infect Immun* 1995 ;63 :1563-1566.

Macciò A, Madeddu C, Massa D, Mudu MC, Lusso MR, Gramignano G, Serpe Benedetto G, Mantovani G. Hemoglobin levels correlate with interleukin-6 levels in patients with advanced untreated ovarian cancer: role of inflammation in cancer-related anemia. *Blood* 2005; 106: 362-367.

Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Cho HJ, Keefer LK, Nachan CF, Young NS. Nitric oxide suppression of human hematopoiesis in vitro. *J Clin Invest* 1995;96:1085-1092.

Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. *Advanced Immunology*. terceira edição:Turin,1996.p.10.1-10.10.

Malyszko J, Malyszko JS, Pawlak K, Mysliwiec M. Heparin, iron status, and renal function in chronic renal failure, kidney transplantation, and hemodialysis. *Am J Hematol*. 2006;81:832-7.

Malyszko J, Malyszko JS, Hryszko T, Pawlak K, Mysliwiec M. Is Heparin a link between anemia, inflammation and liver function in hemodialyzed patients? *Am J Nephrol* 2005; 361: 1-5.

Margetic S, Topic E, Dragica FR, Kkkvaternik M. Soluble transferrin receptor and transferrin receptor-ferritin index in iron deficiency anemia and anemia in rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43(3):326-31.

Markovic M, Majkic-Singh N, Subota V. Usefulness of soluble transferrin receptor and ferritin in iron deficiency and chronic disease. *Scand J Clin Lab Investigation* 2005;65: 571-6.

Marth C, Weiss G, Koza A, Reibnegger G, Daxenbichler G, Zeimet AG, Fuchs D, Wachter H, Dapunt O. Increased production of immune activation marker neopterin by colony-stimulating factors in gynecological cancer patients. *Int J Cancer*. 1994 ;58(1):20-3.

McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, Miret S et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation, *Mol Cell* 2000; 5: 299–309.

Means RT. Jr. Heparin and anaemia. *Blood Rev* 2004; 18: 219-25.

Means,RT. Recent development in the anemia of chronic disease.Curr Hematol Rep 2003;2:116-21.

Means,RT. Advances in anemia of chronic disease.Int J Hematol 1999;70:7-12

Means, RT Pathogenesis of the anemia of chronic disease: a cytokine-mediated anemia, Stem Cells 1995; 13:32-37.

Means RT Jr, Dessypris EN, Krantz SB. Inhibition of human colony-forming-unit erythroid by tumor necrosis factor requires accessory cells.J Clin Invest. 1990 Aug;86(2):538-41.

Melichar B, Solichova D, Svobodova I, Urbanek L,Melicharova K. Urinary neopterin in patients with liver tumors.Tumori 2006;92 (4):318-22.

Miller CB, Jones RJ,Piantadon S, Abeloff MD,Spivak JL. Decreased erythropoetin response in patients with anemia of cancer. N Engl J Med 1990;322:1689-1692.

Mold C, Gewurz H, Du Clos TW. Regulation of complement activation by C-reactive protein. Immunopharmacology 1999; 42:23-30.

Moldawer LL, Marano MA, Wei H . Cachetin/tumor necrosis factor- α alters red blood cell Kinetics and induces anemia in vivo. FASEB J 1989;03:1637-43.

Moulet I, Salles G, Ketterer N, Dumontet C, Bouafia F,Neidhart-Berard EM, Thieblemont C et al. Frequency and significance of anemia in non-Hodgkin's lymphoma patients.Ann of Oncol 1998;9: 1109-1115.

Muckenthaler, M. et al. Regulatory defects in liver and intestine implicate abnormal hepcidin and Cybrd1 expression in mouse hemochromatosis.Nat Genet 2003; 34:102-107.

Mughal T. Anaemia in patients with cancer: na overview .In Bokemeyer C,Ludwig H,editors.ESO Scientifics Updates.Volumee 06.Anaemia in Cancer. Elsevier Science BV,pg 15-23,2001.

Muller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M & Muller MM .Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation. Clin Chim Acta 1998;276:63-74.

Murr C, Widner B, Wirleitner B, Fuchs D. Neopterin as a marker for immune system activation. *Curr Drug Metab.* 2002;3(2):175-87.

Murr C, Bergant A, Widschwendter M, Heim K, Schrocksnadel H & Fuchs D. Neopterin is an independent prognostic variable in females with breast cancer. *Clin Chem* 1999a; 45:1998–2004.

Murr C, Fuith LC, Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G & Fuchs D Increased neopterin concentrations in patients with cancer: indicator of oxidative stress? *Anticancer Res* 1999b; 19:1721–1728.

Nagral A, Mehta AB, Gomes AT, Ellis G, Jackson BF, Sabin CA, McIntyre N. Serum soluble transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency in chronic liver disease. *Clin Lab Haematol* 1999;21(2):93-7.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V et al. IL-6 mediates hipoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone Hecpidin. *J Clin Invest* 2004a; 113: 1271-76.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J et al. Hecpidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004b; 306: 2090-93.

Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hecpidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-63.

Nemeth, E. et al. IL-6 mediates hypoferremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hecpidin. *J Clin Invest* 2004; 113:1271-76.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hecpidin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:4596-601.

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux J et al.. The gene encoding the iron regulatory peptide hecpidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest* 2002;110:1037-44.

Nicolas G, Bennoun M, Devaux I, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, Vaulont S. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:8780-85.

Nowrousian MR. Recombinant human erythropoietin in the treatment of cancer-related or chemotherapy-induced anaemia in patients with solid tumours. *Med Oncol* 1998;15 (1): 19-28.

Obermair A, Handisurya A, Kaider A, Sevela P, Kolbl H, Gitsch G. The relationship of pretreatment serum hemoglobin level to the survival of epithelial ovarian carcinoma patients: a prospective review. *Cancer* 1998 ;83:726-31.

Obermair A, Cheuk R, Horwood K et al. Impact of Hb levels on the response to chemoradiotherapy in patients with cervical cancer. *Cancer* 2001;92: 903-8.

Oguz A,Uzunlulu M,Hekim N. Hepcidin is not a marker of chronic inflammation in atherosclerosis. *Anadolu Kardiyol Derg.* 2006 ;6(3):239-42.

Opasich C, Cazzola M, Scelsi L, De Feo S, Bosimini E, Lagioia R, Febo O, Ferrari R, Fucili A, Moratti R, Tramarin R, Tavazzi L. Blunted erythropoietin production and defective iron supply for erythropoiesis as major causes of anaemia in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J.* 2005 Nov;26(21):2232-7.

Ozguroglu M, Arun B, Demir G, Demirelli F, Mandel NM, Buyukunal E, Serdengecti S, Berkarda B. Serum erythropoietin level in anemic cancer patients. *Med Oncol.* 2000 Feb;17(1):29-34.

Pagel H, Fandrey J, Schobesberger W, Fuchs D, Jelkman W. Effects of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on hypoxia-induced renal erythropoietin production. *Eur J of Haematol* 1999;62:341-345.

Parker AN, Pragnell IB. Inhibitors of haematopoiesis and their potential clinical relevance. *Blood Rev* 1995;9:226-33.

Pasceri V, Chang J, Willerson JT. Modulation of C-reactive protein-mediated monocyte chemoattractant protein-1 induction in human endothelial cells by anti-atherosclerosis drugs. *Circulation* 2001;103:2531-34.

Peetre C, Gullberg U, Nilsson E, Olsson I. Effects of recombinant tumor necrosis factor on proliferation and differentiation of leukemic and normal hemopoietic cells in vitro. Relation to cell surface receptors. *J Clin Investig* 1986;78:1694–700.

Pepys MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol* 1983; 34: 141-212.

Perlutter RM, Cole FS, Kilbridge P, Rossing TH, Colten HR. Expression of the alpha 1 proteinase inhibitor gene in human monocytes and macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:795.

Pigeon C, Ilyin G, Brice Courselaud, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loreal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem* 2001; 276:7811-19.

Punnonen K, Irjala K, Rajamaki A. Serum transferrin Receptor and its ratio to serum Ferritin in the Diagnosis of Iron deficiency. *Blood* 1997;89:1052-57.

Putzki H, Aschern F, Henkel E, Heymann H. Neopterin. A tumor marker in colorectal carcinoma? *Dis Colon Rectum* 1987; 30:879–83.

Recalcati, S., Taramelli, D., Conte, D. and Cairo, G. Nitric oxide-mediated induction of ferritin synthesis in J774 macrophages by inflammatory cytokines: role of selective iron regulatory protein-2 downregulation. *Blood* 1998; 91:1059–66.

Reibnegger G, Egg D, Fuchs D, Gunther R, Hausen A, Werner ER, Wachter H. Urinary neopterin reflects clinical activity in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1986a; 29:1063–70.

Reibnegger GJ, Bichler AH, Dapunt O, Fuchs DN, Fuith LC, Hausen A, Hetzel HM, Lutz H, Werner ER, Wachter H. Neopterin as a prognostic indicator in patients with carcinoma of the uterine cervix. *Cancer Res* 1986b; 46:950–55.

Reibnegger G, Bollbach R, Fuchs D, Hausen A, Judmaier G, Prior C, Rotthauwe HW, Werner ER, Wachter H. A simple index relating clinical activity in Crohn's disease with T cell activation: hematocrit, frequency of liquid stools and urinary neopterin as parameters. *Immunobiology*. 1986c ;173:1-11.

Reibnegger G, Hetzel H, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER & Wachter H .Clinical significance of neopterin for prognosis and follow-up in ovarian cancer. *Cancer Res* 1987;47:4977–81.

Reibnegger G, Fuchs D, Fuith LC, Hausen A, Werner ER, Werner-Felmayer G, Wachter H. Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: application in malignant disease. *Cancer Detect Prev*. 1991;15:483-90.

Remacha AF, Sarda MP, Parellada M, Ubeda J, Manteiga R. The role of serum transferrin receptor in the diagnosis of iron deficiency. *Haematologica* 1998;83:963-6.

Rice L, Alfrey CP, Driscoll TM et al. Neocytolysin contributes to the anemia of renal disease. *Am J Kidney Dis* 1999;33:59-62.

Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med* 2000; 342:836-43.

Rivera S, Liu L, Nemeth E, Gabayan V, Sorensen O E , Ganz T. Heparin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia, *Blood* 2005; 105: 1797-802.

Rodrigues L, Costa FF, Saad ST, Grotto HZ. High levels of neopterin and interleukin-3 in sickle cell disease patients. *J Clin Lab Anal*. 2006;20(3):75-9.

Rodriguez RM, Corwin HL, Gettinger A, Corwin MJ, Gubler D, Pearl RG. Nutritional deficiencies and blunted erythropoietin response as causes of the anemia of critical illness. *J Crit Care* 2001 ;16:36-41.

Rogers, J., Lacroix, L., Durmowitz, G., Kasschau, K., Andriotakis, J. and Bridges, K.R. The role of cytokines in the regulation of ferritin expression. *Adv Exp Med Biol* 1994;356: 127–132.

Romagnani S .Lymphokine production by human T cells in disease states. *Annu Rev Immunol* 1994;12:227–57.

Roque ME, Sandoval MJ, Aggio MC. Serum erythropoietin and its relation with soluble transferrin receptor in patients with different types of anaemia in a locally defined reference population.*Clin Lab Haematol.* 2001 ;23(5):291-5.

Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. *JAMA.* 2005; 293(13):1653-62.

Samsonov MY, Nasonov EL, Tilz GP, Geht BM, Demel U, Gurkina GT, Shtutman VZ, Guseva AG, Wachter H, Fuchs D.Elevated serum levels of neopterin in adult patients with polymyositis/dermatomyositis.*Br J Rheumatol* 1997 ;36:656-60.

Samsonov MY, Tilz GP, Egorova O, Reibnegger G, Balabanova RM, Nasonov EL, Nasonova VA, Wachter H, Fuchs D. Serum soluble markers of immune activation and disease activity in systemic lupus erythematosus.*Lupus* 1995;4(1):29-32.

Samsonov M, Fuchs D, Reibnegger G, Belenkov JN, Nasonov EL, Wachter H. Patterns of serological markers for cellular immune activation in patients with dilated cardiomyopathy and chronic myocarditis.*Clin Chem* 1992;38(5):678-80.

Schooley JC, Kullgren B, Allison AC. Inhibition by interleukin-1 of the action of erythropoietin on erythroid precursors and its possible role in the pathogenesis of hypoplastic anaemias. *Br J Haematol.* 1987 ;67(1):11-7.

Schumacher M, Halwachs G, Tatzber F, Fruhwald FM, Zweiker R, Watzinger N, Eber B, Wilders-Truschnig M, Esterbauer H, Klein W. Increased neopterin in patients with chronic and acute coronary syndromes.*J Am Coll Cardiol.* 1997 ;30(3):703-7.

Seligman PA. Structure and function of transferrin receptor. *Progr Hematol* 1983;13: 181.

Shasha D.The negative impact of anemia on radiotherapy and chemoradiation outcomes.*Semin in Hematol* 2001;38:8-15.

Sheldon J, Riches PG, Soni N, Jorges E, Gore M, Dadian G & Hobbs JR Plasma neopterin as an adjunct to C-reactive protein in assessment of infection. *Clin Chem* 1991; 37: 2038–2042.

Silver DF, Piver MS. Gemcitabine salvage chemotherapy for patients with gynecologic malignancies of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Am J Clin Oncol*. 1999;22:450-2.

Skikne BS. Circulating transferrin receptor assay – Coming of age. *Clin Chem* 1998;44:7-9.

Skillings JR, Sridhar FG, Wong C, Paddock L. The frequency of red cell transfusion for anemia in patients receiving chemotherapy. A retrospective cohort study. *Am J Clin Oncol*. 1993 Feb;16(1):22-5.

Skillings JR, Rogers M, Nabholz J et al. An epidemiological review of anaemia in cancer chemotherapy in Canada. *Eur J Cancer* 1995;31:S5.

Skillings JR, Rogers-Melamed I, Nabholz JM, Sawka C, Gwadry-Sridhar F, Moquin JP et al. An epidemiological review of red cell transfusions in cancer chemotherapy. *Cancer Prev Control*. 1999 ;3: 207-12.

Smaniotto D, Luzi S, Morganti AG, Cellini N. Prognostic significance of anemia and role of erythropoietin in radiation therapy. *Tumori* 2000;86:17-23.

Szmitko PE, Wang C, Weisel RD, Jeffries GA, Anderson TJ, Verma S. New markers of inflammation and endothelial cell activation. *Circulation* 2003;108:1917-23.

Spivak J L. The clinical physiology of erythropoietin. *Semin Hematol* 1993; 30: 2-11.

Sweeney PJ, Nicolae D, Ignacio L et al. Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: final report of a randomised, open-labelled, phase II trials. *Br J Cancer* 1998; 77: 1996-2002.

Takaoka A, Yanai H. Interferon signalling network in innate defence. *Cell Microbiol*. 2006;8(6):907-22.

Teicher BA. Hypoxia and drug resistance. *Cancer Metastasis Rev*. 1994 ;13:139-68.

Theurl I, Mattle V, Seifert M, Mariani M, Marth C, Weiis G. Dysregulated monocytes iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood* 2006; 107: 4142-8.

Thews O, Koenig R, Kelleher DK, Kutzner J, Vaupel P. Enhanced radiosensitivity in experimental tumours following erythropoietin treatment of chemotherapy-induced anaemia. *Brit J of Cancer* 1998;78:752-6.

Thews O, Kelleher DK, Vaupel P. Erythropoietin restores the anemia-induced reduction in cyclophosphamide cytotoxicity in rat tumors. *Cancer Res.* 2001 ;61:1358-61.

Thomas C, Thomas D. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002;48 (7):1066-1076.

Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol* 2005; 11: 14-23.

Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002; 99: 3505-3516.

Torzewski J, Torzewski M, Bowyer DE, Frohlich M, Koenig W, Waltenberguer J, Fitzsimmons C, Hombach V. C-reactive protein frequently colocalizes with the terminal complement complex in the intima of early atherosclerotic lesions of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1386-1392.

Trey JE, Kushner I. The acute phase response and the hematopoietic system: the role of cytokines. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1995;21:1-18.

Ulich TR, Castillo J, Yin S: Tumor necrosis factor exerts dose-dependent effects on erythropoiesis and myelopoiesis in vivo. *Exp Hematol* 1990;18:311.

Ullrich C, Wu A, Armsby C, Rieber S, Wingerter S, Brugnara C, Shapiro D, Bernstein H. Screening healthy infants for iron deficiency using reticulocyte hemoglobin content. *JAMA.* 2005 ;294(8):924-30.

Vaupel PW. Blood flow, oxigenation, tissue pH distribution and bioenergetic status of tumors. *Ernst Schering Research Foundation* 1994;Lecture: 23.

Verma S, Anderson TJ. Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist. *Circulation* 2002;105:546-549.

Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993; 91(4):1351-7.

Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER. Neopterin as marker for activation of cellular immunity: immunologic basis and clinical application. *Adv Clin Chem*. 1989;27:81-141.

Wang CQ, Udupa KB, Lipschitz DA. Interferon-gamma exerts its negative regulatory effect primarily on the earliest stages of murine erythroid progenitor cell development. *J Cell Physiol* 1995;162:134-8.

Wardrop SL, Richardson DA. Interferon gamma and lipopolysaccharide regulation the expression of Nramp2 and increased the uptake of iron from low relative molecular mass complexes by macrophages. *Eur J Biochem* 2000;267:6583-93.

Weinstein DA, Roy CN, Fleming MD, Loda MF, Wolfsdorf JI, Andrews NC. Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. *Blood*. 2002 ;100(10):3776-81.

Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Rev* 2002; 16: 87-96.

Weiss G, Widner B, Zoller H, Schobersberger W, Fuchs D. Immune response and iron metabolism. *Brit J of Anaesthesia* 1998;81:6-9.

Weiss, G., Bogdan, C., Hentze, M.. Pathways for the regulation of macrophage iron metabolism by the antiinflammatory cytokines IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* 1997; 158:420-425.

Weiss G, Goossen B, Doppler W, Fuchs D, Pantopoulos K, Werner-Felmayer G, Wachter H, Hentze MW. Translational regulation via iron-responsive elements by the nitric oxide/NO-synthase pathway. *EMBO J.* 1993 ;12(9):3651-7.

Wians FH Jr, Urban JE, Keffer JH, Kroft SH . Discriminating between iron deficiency anemia and anemia of chronic disease using traditional indices of iron status vs transferrin receptor concentration. *Am J Clin Pathol*. 2001;115(1):112-8.

Winningham ML, Nail LM, Burke MB, et al. Fatigue and the cancer experience: The state of the knowledge. *Oncol Nurs Forum* 1994;21:23-36.

Wintrobe MM, Lukens JN, Lee GR. *Wintrobe Hematologia Clínica* ,9 ed .São Paulo:Ed Manole Ltda;1998.

Wrighting DM, Andrews NC. Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood*. 2006 ;108(9):3204-9.

Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(6):2575-80.

Yap GS, Stevenson MM. Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators of *Plasmodium chabaudi* AS malaria: lack of a major role of interleukin I, tumor necrosis alpha and gamma interferon. *Infect Immun* 1994.;62:357-362.

Yuan ZA, Soprano KJ, Kueppers F. Alpha 1 antitrypsin response of stimulated alveolar macrophages. *J Cell Biochem* 1992;409:410.

8- ANEXOS

Anexo 1



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

✉ Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP

☎ (0_19) 3788-8936

FAX (0_19) 3788-8925

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

✉ cep@fcm.unicamp.br

CEP, 18/05/04.

(Grupo III)

PARECER PROJETO: N° 109/2004

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “AVALIAÇÃO DA ANEMIA EM PACIENTES COM NEOPLASIAS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Michele Leal Vieira Jacober

INSTITUIÇÃO: Laboratório de Hematologia do Depto. de Patologia Clínica/HC/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/03/2004

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 18/05/05

II - OBJETIVOS

Avaliar o perfil hematológico e a prevalência dos diversos tipos de anemia em um grupo de pacientes com neoplasias não hematológicas atendidos no HC - Unicamp e repercussões em sua qualidade de vida

III - SUMÁRIO

Serão acompanhados prospectivamente 500 pacientes adultos de ambos os sexos com neoplasias não hematológicas, com ou sem anemia antes do início do tratamento anti-neoplásico, atendidos nos ambulatórios de Oncologia e enfermarias do HC-Unicamp. Os pacientes previamente sem anemia serão seguidos mensalmente com coletas de sangue a cada consulta de rotina e aplicação de um questionário para avaliação da qualidade de vida.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está descrito adequada e detalhadamente e o termo de consentimento a ser apresentado aos pacientes está satisfatório.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

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 (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). 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. Em caso de projeto 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 (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de maio de 2004.


Prof. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

☒ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas, SP
☎ (0__19) 3788-8936
fax (0__19) 3788-8925
☐ cep@head.fcm.unicamp.br

CEP, 18/05/04
(PARECER PROJETO Nº 109/2004)

PARECER

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "AVALIAÇÃO DA ANEMIA EM PACIENTES COM NEOPLASIAS ATENDIDOS NO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNICAMP"

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Michele Leal Vieira Jacober

II - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a Emenda que inclui pacientes atendidas no CAIS/UNICAMP, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.


Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo 2-Tipos de terapia recebidas pelos pacientes agrupados de acordo com a presença ou ausência de anemia

	Pacientes com câncer e anemia Homens n= 51 Mulheres n=54 Idade Média 60 anos (30-88)*					Pacientes com câncer sem anemia Homens n= 16 Mulheres n=14 Idade Média 56 anos (35-80)*				
Localização	n	terapia				n	terapia			
		R	Q	R+Q	ST		R	Q	R+Q	ST
Cabeça e Pescoço	15		7	6	2	3			3	
Fígado	2		1	1		2		1		1
Gástrico	21	1	11	4	5	1				1
Genito-urinário	3		2	1						
Ginecológico	6		4		2	2	1		1	
Intestino	30		18	7	5	11	1	9	1	
Mama	10		5		5	3		2	1	
Metástase óssea	2	1	1							
Pele	0					1		1		
Próstata	3		1	1	1	2	2			
Pulmão	12		10	2		5		3	2	
Diversos **	1		1							
Total	105	2	61	22	20	30	4	16	8	2

R= Radioterapia; Q= quimioterapia; R+Q= Radioterapia com quimioterapia associada; ST= sem tratamento radio ou quimioterápico. * Não houve diferença significativa entre os grupos estudados quanto ao sexo e idade em pacientes com e sem anemia. **Paciente com câncer em partes moles.

Anexo 3- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do Ferro em pacientes com neoplasia e Anemia Relacionada ao Câncer

n	Idade (anos)	Sexo	Hb (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	RDW (%)	Ret 10 ⁹ /ul	RETY	RETY/V CM	EPO (mIU/ml)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	IST (%)	FTNA (ng/ml)	STfR (mg/L)	STfR/Log FTNA
1	60	F	11,4	72,2	23,2	16,2	56,6	-	-	30,5	323	347	93,08	-	-	-
3	47	F	10,5	107,3	34,8	16,8	68,0	1991	18,56	95,4	57	318	17,92	316,3	1,84	0,98
18	-	M	9,8	95,4	30,2	15,4	73,9	1855	19,44	36,6	61	351	17,38	252,0	2,45	0,71
22	-	M	10,4	99,4	31,8	15,2	58,5	1880	18,91	16,1	94	241	39,00	625,0	1,70	0,59
25	66	M	11,4	96,3	32,1	17,3	55,0	1886	-	42,8	64	262	24,43	83,7	1,66	0,73
30	63	M	10,7	97,2	30,0	15,8	33,2	1845	18,98	15,1	73	458	15,94	50,0	1,40	1,04
39	64	F	10,1	98,1	31,4	15,5	58,0	1873	19,09	-	70	417	16,79	136,8	0,81	0,57
46	69	M	11,9	94,4	31,7	13,8	25,9	2034	21,55	14,3	57	287	19,86	110,0	1,22	0,81
50	70	M	11,8	79,2	28,2	16,6	45,1	1971	24,89	35,7	66	203	32,51	365,0	1,65	0,33
62	72	F	10,3	91,7	29,6	17,2	56,4	1902	20,74	13,9	78	361	21,61	75,3	1,24	0,67
85	-	M	8,3	95,9	30,6	16,1	46,3	1843	19,22	12,2	90	238	37,82	1436,0	1,25	0,45
91	57	F	10,7	88,4	29,6	13,4	13,0	1845	20,87	-	60	362	16,57	177,2	3,06	0,88
96	76	M	11,3	98,8	32,6	13,1	13,5	2043	20,68	30,8	62	180	34,44	273,8	1,43	0,30
106	52	F	11,7	106,3	33,6	16,0	69,9	2002	18,83	18,3	110	379	29,02	104,1	2,41	0,82
125	56	M	10,3	97,4	31,6	17,0	58,0	1976	20,29	17,4	111	363	30,58	414,8	1,98	0,80
127	64	M	8,8	90,5	32,0	16,3	26,1	1934	21,37	110,0	248	239	103,77	506,4	0,73	0,42
141	54	M	11,8	87,4	31,0	12,7	72,4	1921	21,98	13,3	101	350	28,86	371,9	1,66	0,61
154	45	M	7,6	96,7	30,9	18,8	82,2	1775	18,36	126,0	76	362	20,99	381,5	2,09	1,07
170	78	M	11,6	92,9	30,4	15,0	18,3	2005	21,58	17,8	108	183	59,02	615,0	1,13	0,29
173	73	M	10,7	87,2	29,8	17,9	67,5	1985	22,76	28,9	74	324	22,84	200,1	1,57	0,63
188	67	M	10,4	87,6	28,0	15,9	-	-	-	24,9	58	223	26,01	1246,0	2,75	0,24
203	63	F	8,1	105,3	35,5	18,4	64,1	2146	20,38	880,0	183	332	55,12	1545,0	0,81	0,83
213	55	F	11,0	93,5	29,7	14,3	34,4	1929	20,63	23,7	61	382	15,97	86,5	1,44	0,91
223	57	F	11,6	95,9	29,9	13,8	54,7	1887	19,68	28,4	58	290	20,00	177,7	0,74	0,95
224	52	M	11,7	96,3	31,0	19,6	83,3	1995	20,72	49,1	145	224	64,73	283,7	2,65	0,60

227	50	M	11,5	94,4	32,3	14,0	41,7	1943	20,58	14,7	53	261	20,31	244,7	1,76	0,37
231	46	F	11,8	90,2	29,8	-	-	-	-	12,5	75	204	36,76	62,2	2,13	0,60
234	61	M	9,2	93,6	30,8	15,9	29,9	1976	21,11	-	62	191	32,46	1074,0	1,46	0,29
237	75	M	10,9	91,8	29,6	15,3	76,9	1943	21,17	13,5	108	284	38,03	155,1	0,89	0,67
238	73	F	11,0	86,5	28,5	-	-	-	-	17,7	60	260	23,08	131,1	1,07	0,83
240	74	M	9,9	89,5	28,0	15,7	51,0	1869	20,88	20,0	62	319	19,44	246,3	0,87	0,77
241	67	M	11,2	115,5	38,6	16,8	60,6	2116	18,32	-	108	306	35,29	198,9	1,46	0,59
242	76	F	10,2	84,0	27,3	17,8	37,4	1873	22,30	14,0	55	351	15,67	99,1	1,76	0,69
248	59	F	11,0	87,6	27,9	19,0	73,3	1965	22,43	40,4	66	262	25,19	194,3	1,84	0,79
249	60	M	11,9	88,6	28,8	19,8	69,4	1910	21,56	20,3	52	233	22,32	291,0	1,35	0,70
251	30	M	10,9	85,0	28,6	-	0,0	-	-	15,5	52	247	21,05	103,8	1,38	0,70
306	79	F	11,7	83,9	28,1	18,3	100,1	1832	21,84	48,8	58	241	24,07	132,6	1,80	0,78
315	48	M	11,7	90,5	31,0	17,8	72,2	2025	22,38	39,6	118	326	36,20	130,0	1,72	0,84
319	56	M	11,5	92,7	29,0	15,7	49,5	1845	19,90	51,0	71	363	19,56	78,6	1,42	0,84
320	88	F	10,5	103,9	34,4	16,6	35,1	-	-	13,1	70	348	20,11	115,8	4,12	1,31
325	55	F	10,0	82,4	26,2	16,8	33,1	-	-	14,9	81	270	30,00	295,5	1,66	0,48
330	79	F	11,5	83,9	26,9	15,4	77,5	1847	22,01	19,3	44	200	22,00	435,7	1,78	0,72
333	50	F	11,1	89,3	29,0	14,1	53,6	1889	21,15	27,8	101	287	35,19	73,3	1,60	1,43
350	67	F	11,2	87,5	28,1	18,6	91,0	1894	21,65	30,4	52	216	24,07	172,8	2,70	0,81
356	65	M	11,1	93,4	31,8	17,9	82,7	1979	21,19	33,7	106	199	53,27	623,2	1,19	0,57
369	57	F	11,0	99,7	31,5	18,4	78,5	1880	18,86	31,7	95	258	36,82	193,3	1,91	0,78
392	57	F	11,9	88,2	30,0	14,1	51,2	1933	21,92	52,3	64	306	20,92	169,0	2,67	0,72
398	55	F	8,6	83,8	28,4	18,1	64,2	-	-	45,4	81	254	31,89	279,8	1,81	1,24
400	54	M	11,4	88,3	30,4	15,5	76,9	1966	22,27	46,6	79	269	29,37	419,0	1,58	0,37
418	32	F	11,7	88,1	29,0	-	-	-	-	20,1	76	364	20,88	109,4	1,79	0,82
419	78	M	11,4	87,2	28,0	-	-	-	-	6,6	81	275	29,45	1024,0	1,61	0,51
434	62	F	10,5	91,9	30,3	15,7	-	-	-	33,6	56	278	20,14	298,3	3,04	0,90

Anexo 4- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do Ferro em pacientes com neoplasia e Anemia de Doença Crônica

n	Idade (anos)	Sexo	Hb (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	RDW (%)	Ret (10 ⁹ /ul)	RETY	RETY/V CM	EPO (mIU/ml)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	IST (%)	FTNA (ng/ml)	STfR (mg/L)	STfR/Log FTNA
12	48	F	8,5	83,8	28,6	16,4	11,0	1939	23,14	241,0	44	361	12,19	275,3	1,12	0,46
13	73	M	10,3	97,1	30,1	18,8	79,0	1667	17,17	24,6	28	235	11,91	778,3	2,74	0,95
43	75	M	10,1	90,0	31,7	15,6	56,5	1759	19,54	16,5	26	220	11,82	339,8	0,82	0,32
65	61	M	9,4	94,1	30,6	15,4	65,7	1760	18,70	28,5	40	276	14,49	744,2	1,16	0,40
70	46	M	10,8	96,5	31,6	14,4	48,2	1792	18,57	27,0	35	377	9,28	223,7	1,83	0,78
76	64	F	9,5	93,2	28,1	14,2	27,4	1777	19,07	16,2	41	271	15,13	303,8	1,44	0,58
78	-	M	11,6	84,3	27,2	17,2	35,8	1864	22,11	23,1	28	229	12,23	260,2	2,37	0,98
100	65	F	8,6	78,8	25,0	17,2	32,7	1644	20,86	40,5	23	222	10,36	991,1	3,49	1,16
111	67	M	9,2	85,2	27,8	16,5	-	-	-	57,4	30	241	12,45	711,4	0,94	0,33
115	78	M	10,3	87,5	27,5	16,1	52,9	1623	18,55	73,3	43	335	12,84	243,6	2,29	0,96
131	52	F	11,9	87,7	29,2	-	-	-	-	10,0	34	223	15,25	62,5	1,66	0,92
155	73	M	10,4	85,9	27,1	14,0	-	-	-	9,9	45	322	13,98	188,4	1,44	0,63
162	51	M	11,5	85,4	26,2	18,4	58,8	1552	18,17	56,3	23	231	9,96	798,3	2,69	0,93
167	59	M	9,5	85,1	26,2	16,5	64,3	1636	19,22	52,4	51	256	19,92	2646,0	2,22	0,65
183	53	F	10,3	101,9	32,6	16,9	-	-	-	133,0	32	248	12,90	863,7	0,75	0,26
185	39	M	9,1	88,2	28,3	14,3	-	-	-	15,5	42	292	14,38	363,7	1,22	0,48
198	67	F	11,1	83,4	25,6	-	-	-	-	9,4	11	180	6,11	243,1	1,36	0,57
201	62	M	10,5	76,7	24,0	19,2	67,0	1599	20,85	67,9	35	349	10,03	426,1	0,91	0,35
208	43	F	11,8	77,8	25,0	-	49,6	-	-	45,3	34	211	16,11	131,2	1,28	0,60
228	66	F	10,4	88,2	27,9	17,6	-	-	-	14,6	44	363	12,12	1051,0	1,88	0,62
293	48	M	11,2	88,2	28,8	13,1	30,3	1833	20,78	14,5	26	192	13,54	381,7	1,12	0,43
308	54	M	11,3	99,4	31,6	15,1	54,8	1934	19,46	15,5	48	214	22,43	194,6	2,42	1,06
312	59	F	11,7	80,8	24,9	14,8	38,5	1597	19,76	27,3	17	145	11,72	122,7	0,13	0,06
316	39	F	11,1	77,0	25,5	13,2	67,4	1837	23,86	14,6	30	112	26,79	360,8	1,45	0,57

321	59	M	9,9	81,8	25,4	17,3	16,4	-	-	26,0	20	185	10,81	258,9	2,16	0,90
367	79	F	11,5	81,3	27,2	15,1	53,7	1728	21,25	26,8	29	210	13,81	165,1	1,79	0,81
389	41	F	11,4	86,1	29,3	14,1	38,1	1794	20,84	29,0	41	194	21,13	104,3	1,84	0,91
415	45	M	8,2	86,5	29,2	15,6	-	-	-	48,9	13	159	8,18	676,6	1,77	0,63
431	46	F	8,0	79,4	24,9	17,0	-	-	-	30,8	29	185	15,68	1594,0	2,07	0,65

Hb=hemoglobina, VCM=Volume corpuscular médio, Ret=contagem de reticulócitos absoluta, Fe = Ferro, TIBC=Capacidade Total de Ligação de Ferro, IST= Índice de Saturação da Transferrina , sTfR= Receptor solúvel da transferrina, FTNA = ferritina, EPO= Eritropoetina , -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 5- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do Ferro em pacientes com neoplasia e Anemia Ferropriva

n	Idade (anos)	Sexo	Hb (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	RDW (%)	Ret (10 ⁹ /ul)	RETY	RETY/VCM	EPO (mIU/ml)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	IST (%)	FTNA (ng/ml)	STfR (mg/L)	STfR/Log FTNA
6	57	M	9,9	80,5	25,1	21,7	23,2	1894	23,53	37,8	50	441	11,34	18,5	2,43	1,92
7	31	F	11,3	78,2	24,9	17,9	39,0	1677	-	24,6	21	451	4,66	5,1	-	-
17	55	F	11,5	88,3	28,5	15,6	66,1	1805	-	33,2	50	343	14,58	31,5	2,27	1,52
32	65	M	11,3	93,1	29,8	14,8	49,3	1793	19,26	20,1	41	272	15,07	57,8	1,64	0,93
45	37	F	9,8	78,6	24,7	17,9	54,0	1533	19,50	32,7	48	408	11,76	9,5	2,34	2,39
75	37	F	10,9	90,9	28,4	16,1	58,8	1827	20,10	65,1	57	438	13,01	33,4	2,26	1,48
87	59	F	10,5	77,7	23,7	18,0	63,8	1650	21,24	41,4	29	287	10,10	21,7	1,73	1,30
88	-	F	10,9	91,6	28,6	15,9	11,0	1900	20,74	24,5	42	439	9,57	128,6	8,51	1,14
113	74	M	8,5	77,7	25,3	18,4	40,3	1532	19,72	36,3	21	264	7,95	69,7	2,71	1,47
116	76	F	9,7	72,7	20,9	17,2	51,6	1359	18,69	45,3	34	575	5,91	6,8	7,66	9,17
118	71	M	9,9	68,3	19,4	17,4	77,7	1380	20,20	59,8	77	443	17,38	19,6	2,46	1,90
132	66	F	10,0	79,2	24,8	16,6	-	1780	22,47	31,9	32	397	8,06	119,9	2,47	1,19
134	46	F	11,7	86,4	27,5	-	-	-	-	29,0	25	513	4,87	6,9	1,17	1,40
144	72	M	9,0	78,0	25,1	15,8	71,8	1555	19,94	94,6	39	429	9,09	108,7	3,66	1,80
147	78	F	9,5	74,9	23,9	19,7	39,4	1620	21,63	34,5	41	438	9,36	9,7	3,39	3,44
151	70	F	11,4	87,9	26,5	20,7	44,7	1682	19,14	12,8	49	432	11,34	24,9	2,18	1,56
153	57	F	10,1	81,6	23,5	15,6	113,1	1531	18,76	74,9	37	423	8,75	14,7	5,06	4,33
254	84	F	11,5	87,4	26,9	-	-	-	-	17,7	59	345	17,10	14,3	1,14	0,99
292	41	F	11,7	68,1	20,5	17,3	65,6	1464	21,50	41,3	23	384	5,99	2,8	5,16	11,66
314	62	F	9,7	71,7	22,4	21,9	68,6	-	-	67,6	41	319	12,85	14,9	2,16	1,84
317	60	M	11,3	87,3	27,2	15,0	82,8	1807	20,70	23,3	49	432	11,34	62,2	2,73	1,52
343	52	M	8,7	66,5	19,4	18,3	49,7	-	-	65,7	26	420	6,19	17,3	1,98	1,60
390	64	F	11,7	91,3	30,0	17,0	92,0	1930	21,14	51,1	46	322	14,29	-	2,81	-
406	62	F	11,8	80,5	26,1	-	-	-	0,00	40,2	25	362	6,91	11,0	2,12	2,04

Anexo 6- Parâmetros hematimétricos e relacionados ao metabolismo do Ferro em pacientes com neoplasia sem Anemia

n	Idade (anos)	Sexo	Hb (g/dl)	VCM (fL)	HCM (pg)	RDW (%)	Ret (10 ⁹ /ul)	RETY	RETY/VCM	EPO (mIU/ml)	Fe (ug/dl)	TIBC (ug/dL)	IST (%)	FTNA (ng/ml)	STfR (mg/L)	STfR/Log FTNA
5	55	M	15,8	97,4	34,3	14,3	61.6	1940	19,92	7,1	98	406	24,14	41,2	2,20	1,36
48	61	M	14,7	92,7	32,3	16,9	74.6	1988	21,45	17,2	72	395	18,23	-	1,97	-
56	56	F	14,7	91,2	31,7	14,4	63.6	1933	21,20	10,8	245	272	90,07	-	1,24	-
73	53	M	15,6	88,3	28,9	13,5	68.5	1816	20,57	7,3	60	378	15,87	184,4	2,15	0,95
79	64	F	12,7	82,2	26,9	17,4	49.6	1800	21,90	-	52	297	17,51	48,6	2,18	1,29
80	62	F	12,8	92,2	31,3	13,4	51.9	1799	19,51	23,2	52	315	16,51	340,2	1,89	0,75
92	57	M	16,0	95,2	32,1	13,4	38.8	1907	20,03	17,1	172	477	36,06	54,5	1,50	0,86
93	50	F	12,9	91,2	29,7	14,4	92.0	1900	20,83	29,0	140	450	31,11	174,5	1,76	0,79
95	44	M	16,0	88,2	29,5	13,3	50.9	1832	20,77	12,0	74	339	21,83	86,5	1,59	0,82
99	80	M	13,5	99,1	31,8	14,9	38.3	1889	19,06	14,8	61	348	17,53	95,6	0,97	0,49
105	77	F	14,4	97,3	32,1	14,5	65.9	1860	19,12	13,6	75	461	16,27	116,1	1,98	0,96
107	35	M	15,9	86,0	29,7	16,4	64.2	1878	21,84	9,9	112	551	20,33	-	1,46	-
110	52	F	12,0	97,8	32,3	14,0	62.3	-	-	24,6	73	219	33,33	70,9	1,38	0,75
120	71	M	13,3	96,1	30,6	15,5	77.7	1885	19,61	19,3	47	255	18,43	382,9	1,90	0,74
123	74	F	14,7	93,6	30,4	13,8	41.6	1900	20,30	12,0	113	266	42,48	167,9	1,25	0,56
158	76	M	13,6	95,7	32,7	12,8	70.7	1869	19,53	28,2	77	233	33,05	438,7	2,18	0,83
159	64	F	13,4	94,5	31,8	13,2	47.3	1869	19,78	13,6	107	337	31,75	316,2	1,52	0,61
165	56	F	13,9	91,0	29,6	13,4	50.2	1913	21,02	10,7	93	317	29,34	93,0	1,41	0,72
184	74	F	12,2	93,5	30,3	13,5	46.2	-	-	36,4	75	354	21,19	270,3	1,48	0,61
187	55	F	13,9	88,9	29,7	14,3	74.9	-	-	16,4	42	406	10,34	122,5	0,73	0,35
193	52	M	14,1	89,6	29,9	16,7	65.0	-	-	19,1	85	245	34,69	527,3	1,11	0,41
194	54	F	12,4	87,8	27,6	17,6	36.9	1993	22,70	15,8	62	369	16,80	96,9	1,23	0,62
205	50	F	12,4	94,2	29,9	16,4	51.0	1908	20,25	10,9	84	369	22,76	126,4	2,38	1,13
220	45	M	15,2	96,5	33,0	12,8	98.9	1969	20,40	9,2	101	229	44,10	1179,0	1,86	0,61
226	62	M	13,5	90,4	29,4	14,7	43.1	1993	22,05	16,3	105	333	31,53	1169,0	1,27	0,41

229	46	M	13,6	81,3	26,5	14,2	82.8	1794	22,07	14,1	43	287	14,98	601,8	1,40	0,50
260	52	M	13,8	92,6	31,1	13,5	46.6	2000	21,60	33,1	62	394	15,74	246,7	1,55	0,65
281	43	M	13,8	93,1	30,8	15,3	93.2	1944	20,88	15,3	111	462	24,03	37,9	1,90	1,20
283	57	M	13,1	87,7	29,2	17,2	65.4	2006	22,87	36,9	120	372	32,26	784,7	1,26	0,44
322	67	F	12,0	89,8	30,0	14,8	63.2	1968	21,92	14,1	-	-	17,53	-	1,31	-

Hb=hemoglobina, VCM=Volume corpuscular médio, Ret=contagem de reticulócitos absoluta, Fe = Ferro, TIBC=Capacidade Total de Ligação de Ferro, IST= Índice de Saturação da Transferrina , sTfR= Receptor solúvel da transferrina, FTNA = ferritina, EPO= Eritropoetina , -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 7- Parâmetros relacionados a resposta inflamatória em pacientes com neoplasia e Anemia Relacionada ao Câncer

n	PCR (mg/dl)	IL6 (pg/ml)	IL1-β (pg/ml)	TNF-α (pg/mL)	Pró-Hep (ng/ml)	Neop (nmol/L)	VHS (mm3)
1	0,73	1,69	0,60	-	285,0	8,2	-
3	0,85	12,32	0,50	2,31	315,0	6,0	73
18	0,43	5,44	0,26	2,07	138,8	8,7	74
22	1,31	4,21	0,39	1,42	140,3	9,4	-
25	1,22	9,43	0,24	1,54	358,0	9,9	106
30	0,42	7,42	0,97	1,82	196,0	9,1	93
39	-	6,05	-	-	157,4	9,0	92
46	0,84	-	0,14	-	302,0	9,8	51
50	4,60	10,17	0,44	2,34	254,0	8,9	100
62	0,54	9,85	0,10	2,54	175,9	9,2	98
85	5,64	3,99	0,50	1,79	196,2	18,0	134
91	-	4,04	-	-	219,1	8,7	82
96	4,10	10,88	0,12	1,34	157,0	9,3	103
106	0,18	1,64	0,23	2,86	221,0	8,4	58
125	0,38	6,63	0,14	0,85	307,7	9,0	92
127	0,90	2,93	0,13	0,85	310,5	9,7	61
141	1,27	5,71	0,66	2,58	257,0	9,3	120
154	0,70	6,30	1,50	3,48	167,4	9,1	132
170	0,46	7,53	0,07	0,81	286,0	8,0	39
173	1,70	-	0,07	1,33	222,2	9,7	98
188	8,22	46,80	7,41	15,69	246,6	32,0	116
203	0,76	5,20	0,05	1,08	288,6	8,4	132
213	-	7,89	0,23	-	288,0	5,0	-
223	0,08	3,22	0,04	2,78	233,0	8,8	55
224	0,30	10,54	0,08	10,33	232,0	5,0	43
227	2,27	10,91	0,40	24,39	266,0	6,5	87
231	0,87	2,23	0,22	-	281,0	8,7	51
234	16,30	25,10	1,98	2,29	158,2	85,0	-
237	0,28	0,00	0,21	1,54	199,3	7,5	-
238	0,32	-	0,08	1,96	289,0	8,3	-

240	0,38	10,47	0,11	7,73	565,0	8,5	59
241	0,12	-	-	2,61	228,0	6,5	80
242	0,14	57,40	1,92	-	-	9,5	-
248	0,97	7,77	0,55	1,98	-	29,0	91
249	2,70	9,97	0,89	-	1222,0	7,5	113
251	0,12	2,92	1,10	2,37	230,0	9,9	12
306	1,69	10,04	0,11	3,07	181,0	9,7	121
315	0,58	7,80	0,34	1,62	434,0	10,0	-
319	1,20	10,47	0,74	1,48	257,0	-	-
320	0,02	6,38	0,27	0,86	275,0	9,9	-
325	1,23	2,93	0,17	1,05	380,0	9,4	-
330	1,01	4,32	0,13	1,48	350,0	9,9	41
333	0,05	1,67	0,10	2,57	578,0	8,6	58
350	0,58	8,91	0,09	2,77	289,0	46	24
356	1,73	10,38	0,06	1,94	396,0	9,4	114
369	0,10	-	0,08	-	324,0	8,1	24
392	13,50	2,28	0,49	1,26	214,0	8,6	98
398	0,12	1,65	0,18	1,36	295,0	9,1	125
400	0,68	9,14	0,04	1,80	201,0	9,8	-
418	0,02	1,37	0,08	1,82	344,0	6,4	43
419	0,29	10,49	0,25	2,49	305,0	11	75
434	0,08	1,48	0,44	2,15	176,0	8,7	66

PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1 β = Interleucina 1 beta, TNF α = Fator de necrose Tumoral alfa , Neop = Neopterinina , Pró-Hep = Pró- hepcidina, -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 8- Parâmetros relacionados a resposta inflamatória em pacientes com neoplasia e Anemia de Doença Crônica

n	PCR (mg/dl)	IL6 (pg/ml)	IL1-β (pg/ml)	TNF-α (pg/mL)	Pró-Hep (ng/ml)	Neop (nmol/L)	VHS (mm3)
12	7,97	39,40	0,42	1,15	268,0	7,9	146
13	15,50	57,60	1,31	2,81	294,5	9,8	106
43	10,60	57,70	0,52	5,20	-	9,7	79
65	7,30	3,90	1,29	4,21	255,9	9,8	135
70	10,10	19,70	0,34	2,30	172,8	8,5	117
76	4,76	13,95	0,37	3,04	219,1	9,3	127
78	0,64	6,94	0,29	1,87	365,0	9,3	57
100	24,60	74,80	-	-	236,0	9,6	135
111	20,80	115,50	7,96	2,21	242,7	16,0	134
115	7,42	16,80	0,75	14,08	138,1	9,8	126
131	5,99	6,56	0,55	1,70	96,0	16,0	-
155	1,57	11,09	1,41	3,40	361,7	60,0	114
162	14,20	10,19	1,22	1,86	-	6,0	140
167	18,70	20,00	0,88	3,90	223,0	7,8	128
183	29,30	249,30	0,51	6,98	272,8	8,9	144
185	4,45	18,80	0,58	2,15	264,4	78,0	132
198	13,00	10,34	0,41	1,91	311,0	9,7	-
201	8,91	9,85	2,45	3,27	293,8	28,0	125
208	4,23	10,46	0,78	5,62	252,0	69,0	84
228	0,91	3,50	0,33	-	271,0	8,3	119
293	2,26	10,19	0,16	-	292,0	9,3	135
308	-	10,42	0,11	1,46	244,0	7,8	134
312	6,89	10,37	0,18	-	197,0	9,6	-
316	0,49	1,14	0,35	-	408,0	8,4	-
321	4,10	11,17	0,15	3,13	287,0	12,0	-
367	1,95	2,17	0,01	1,11	226,0	6,3	76
389	0,77	4,75	0,16	2,62	226,0	9,5	87
415	9,60	11,28	0,17	1,26	244,0	3,6	-
431	14,30	-	0,88	-	479,0	9,8	105

PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1β= Interleucina 1 beta , TNFα= Fator de necrose Tumoral alfa , Neop = Neopterinina , Pró-Hep = Pró- hepcidina, -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 9- Parâmetros relacionados a resposta inflamatória em pacientes com neoplasia e Anemia Ferropriva.

n	PCR (mg/dl)	IL6 (pg/ml)	IL1-β (pg/ml)	TNF-α (pg/mL)	Pró-Hep (ng/ml)	Neop (nmol/L)	VHS (mm3)
6	0,33	2,03	0,16	1,76	112,7	8,1	34
7	-	0,80	0,64	2,13	209,0	7,9	31
17	0,26	3,79	0,16	1,34	244,0	7,8	49
32	0,76	10,13	0,20	1,99	257,0	7,2	116
45	1,49	4,45	0,44	2,22	211,2	6,8	68
75	-	2,29	0,61	2,58	188,3	-	70
87	3,07	10,30	0,05	-	159,0	7,8	85
88	-	2,63	0,03	1,29	57,1	6,7	63
113	12,60	32,10	0,09	1,67	218,3	14,0	55
116	0,08	1,49	0,16	3,75	226,9	8,6	57
118	1,07	9,00	1,58	3,73	159,0	9,3	42
132	0,41	8,20	0,32	3,64	189,9	8,2	130
134	0,59	1,42	0,09	1,23	196,0	7,8	46
144	7,51	15,02	0,49	4,01	309,1	9,8	127
147	0,21	2,85	0,27	1,44	178,2	9,9	79
151	0,02	1,92	0,20	1,44	386,0	9,3	33
153	0,19	1,74	0,24	1,03	169,7	-	-
254	0,12	5,71	0,25	2,83	278,0	8,0	48
292	0,10	2,13	0,03	2,56	170,0	8,3	20
314	0,32	4,91	0,33	1,69	233,0	4,8	-
317	0,41	3,62	0,49	1,84	302,0	9,7	-
343	7,11	10,54	1,20	21,13	372,0	9,5	112
390	0,88	11,02	0,06	0,84	260,0	9,4	103
406	1,90	-	0,12	2,06	188,0	10,0	-

PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1β= Interleucina 1 beta , TNFα= Fator de necrose Tumoral alfa , Neop = Neopterina , Pró-Hep = Pró- hepcidina, -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 10- Parâmetros relacionados a resposta inflamatória em pacientes com neoplasia sem anemia.

n	PCR (mg/dl)	IL6 (pg/ml)	IL1-β (pg/ml)	TNF-α (pg/mL)	Pró-Hep (ng/ml)	Neop (nmol/L)	VHS (mm3)
5	0,04	5,36	0,20	1,20	167,4	8,2	-
48	0,109	-	0,02	1,10	335,8	78,0	9
56	0,51	8,20	-	1,81	304,0		39
73	1,43	-	0,94	2,76	468,0	9,9	39
79	2,02	3,20	0,23	1,87	230,9	7,2	93
80	2,07	5,70	0,28	3,09	210,4	9,0	131
92	0,02	0,00	0,06	0,99	248,1	7,5	8
93	0,85	0,00	0,11	1,80	238,0	16,0	79
95	0,12	2,50	0,25	2,34	175,9	46,0	5
99	0,33	0,00	0,19	1,94	222,2	9,2	44
105	0,71	2,50	0,34	2,65	212,0	8,5	21
107	0,34	0,00	0,49	1,47	100,8	8,0	24
110	0,59	1,60	0,10	1,30	208,8	81,0	58
120	5,72	37,60	-	2,66	-	9,8	129
123	0,06	0,00	0,04	1,53	236,0	9,5	4
158	0,07	-	0,08	1,23	331,0	9,9	56
159	0,27	0,00	0,08	1,85	-	7,7	82
165	0,16	2,20	0,07	1,74	323,0	8,5	50
184	0,22	65,30	0,70	3,12	219,0	38,0	35
187	2,50	-	0,17	39,03	218,0	5,8	42
193	4,94	0,00	-	2,73	116,0	9,8	76
194	0,18	-	0,03	1,70	579,0	7,2	61
205	0,06	5,20	0,08	1,69	-	8,3	56
220	0,25	0,00	0,25	8,12	264,0	8,7	42
226	0,49	2,20	0,06	30,46	-	8,4	83
229	4,22	11,60	0,08	7,79	255,0	9,7	99
260	0,36	1,10	-	0,10	-	9,7	45
281	0,21	3,50	0,10	5,45	151,0	5,0	21
283	0,77	5,40	0,11	2,39	220,0	9,3	102
322	0,26	-	-	1,83	847,0	9,4	-

PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação, IL-6=Interleucina 6, IL-1β= Interleucina 1 beta, TNFα= Fator de necrose Tumoral alfa, Neop = Neopterin, Pró-Hep = Pró- hepcidina, -= Análises não realizadas ou dados não obtidos.

Anexo 11- Valores de Curva ROC para diferenciação entre os grupo ADC e AF

Variáveis	Área da curva ROC (95%)	Sensibilidade e especificidade	Valores de corte
RET-Y	0.608 (0.422- 0.794)	100.0% e 31.6%	≥ 1542
TIBC (ug/dL)	0.935 (0.875- 0.994);	69.0% e 100.0%	≤ 260
IST (%)	0.727 (0.587- 0.867)	72.4% e 70.8%	≥ 11.79
sTfR (mg/l)	0.797 (0.675- 0.918)	69.0% e 82.6%	≤ 1.93
sTfR log FTNA	0.987 (0.966- 1.000)	93.1% e 95.5%	≤ 0.9845
PCR (mg/dL)	0.874 (0.774- 0.975)	82.1% e 81.0%	≥ 1.925
VHS (fL)	0.882 (0.785- 0.980);	95.8% e 65.0%	≥ 73.00

RET-Y= Valor médio do espalhamento da luz na população de reticulócitos, TIBC=Capacidade Total de Ligação de Ferro, IST= Índice de Saturação da Transferrina , sTfR= Receptor solúvel da transferrina, FTNA = ferritina PCR= Proteína C Reativa, VHS= velocidade de hemossedimentação

Anexo 12- Artigo aceito para publicação na revista Medical Oncology em 15/12/2006.

**Anaemia in patients with cancer: role of inflammatory activity on iron metabolism
and severity of anaemia**

Jacober, MLV*, Mamoni, RL*, Lima, CSP**, Grotto, HZW*, Anjos B*

*Department of Clinical Pathology and ** Department of Internal Medicine, Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, São Paulo, Brazil

Postal code 13083-970

Correspondence to: Helena Zerlotti Wolf Grotto

Departamento de Patologia Clínica/FCM/UNICAMP

Caixa Postal 6111, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil

Email: grotto@fcm.unicamp.br

Fax: 55 19 3788 9434 Grant Sponsors:

FAPESP (grant no 08733-8/2004) and FAEP/UNICAMP (grant no 369/04)

Running title: Inflammation and anaemia in cancer patients

Key words: anaemia of chronic disease, cancer, hepcidin, interleukins, C-reactive protein, iron metabolism, inflammation

Abstract

Hepcidin has been proposed as an important factor in the pathogenesis of the anaemia of chronic disease (ACD). The aim of this study was to assess the relationship between anaemia and inflammatory activity in patients with solid tumours. Patients were classified as having iron deficiency anaemia (IDA) (hypoferremia and hypoferritinemia), ACD (hypoferremia, normal or increased serum ferritin) and anaemia related to cancer (ARC) (no abnormalities in iron status). Serum pro-hepcidin, IL-6, C-reactive protein (CRP) and iron status parameters were measured using commercial kits. CRP and IL-6 levels were significantly higher in patients with ACD when compared to IDA, ARC and non anaemic patients ($p < 0.005$). Serum pro-hepcidin levels were not different among all studied groups ($p = 0.138$). A negative correlation was observed between haemoglobin and serum ferritin, CRP and IL-6 levels only in group of ACD. Serum pro-hepcidin concentrations were not correlated with degree of anaemia or iron metabolism parameters. According to our results the inflammatory activity represented by high levels of IL-6 and CRP are involved in the pathogenesis of ACD, probably due to the action of inflammation on iron metabolism, but not in ARC. It was not possible to demonstrate a significant effect of pro-hepcidin on the anaemia in cancer patients.

1. Introduction

Anaemia is one of the most common conditions in patients with cancer. The severity of anaemia depends on tumour type, stage of disease, patient age, type and intensity of treatment [1]. Anaemia in patients with cancer is caused by many factors, including acute and chronic bleeding, bone marrow infiltration, effects of chemotherapy and radiotherapy, intercurrent infections, autoimmune haemolysis and iron and vitamin deficiencies [2], which could act as single or combined events. Additional factors, such as inborn errors of haemoglobin synthesis may hamper a precise diagnostic [3]. Therefore, the exact mechanism involved in the pathogenesis and a precise diagnosis of anaemia in patients with cancer frequently is difficult to define.

Anaemia of chronic disease (ACD) is the most common form of anaemia in cancer patients and it is secondary to activation of the immune and inflammatory systems by the tumour cell and consequent release of several cytokines, such as tumour necrosis factor, interleukin-1 and interferon- γ [reviewed in 4].

Hepcidin is a peptide synthesized by liver in response to anaemia, hypoxia and inflammation. The cytokine IL-6 is the main inducer of hepcidin synthesis [5] and higher levels of IL-6 have been reported in patients with malignant tumours [6]. It has been suggested that hepcidin is an important mediator of ACD because it acts as an inhibitor of iron absorption in the intestine and iron release from macrophages. Then, hepcidin would contribute to the hypoferremia, usually observed in infection and inflammation processes [7, 8]. Additionally, hepcidin may inhibit erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations and therefore, contribute to ACD in patients with cancer [9].

The present study was carried out to investigate the relationship between inflammatory process activity and severity of anaemia in a group of patients with solid tumours.

2. Patients and methods

The study was approved by the local Ethical Committee and all subjects participated as volunteers, after signing an informed written consent.

One hundred and five patients with cancer and anaemia, and thirty patients with cancer without anaemia (NoA), seen at the university hospital from March 2004 to March 2006, were enrolled in study. Their clinical characteristics are reported in Table 1. Patients with acute bleeding, haemolytic or megaloblastic anaemia, bone marrow aplasia after chemotherapy or radiotherapy, as well as those with hemoglobinopathy were excluded from the analyses.

2.1- Blood sampling

Complete blood counts and reticulocyte parameters including RET-Y, an estimation of reticulocyte size and Hb content [10], were determined on a Sysmex

XE-2100 haematology analyser (Sysmex, Kobe, Japan) in blood samples collected into an ethylenediamine-tetraacetic acid vacuum tube. RET-Y is measured in arbitrary units (channel numbers), corresponding to the signal proportional to the size of reticulocytes.

2.2- Evaluation of iron status

The concentration of serum iron (SI) and total iron-binding capacity (TIBC) were determined using commercial kits from Synermed International (Westfield, IN, USA). The serum ferritin (SF) was determined by an electrochemiluminescence immunoassay test (Elecsys Ferritin, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and the serum concentration of soluble transferrin receptor (sTfR) was measured by nephelometric technique (Dade Behring, Marburg, Germany).

2.3- Evaluation of inflammatory activity

C-reactive protein (CRP) levels were determined by nephelometric technique (Dade Behring, Marburg, Germany); erythrocyte sedimentation rate (ESR) was measured in an automated closed system (Sedisystem, Becton Dickinson, Meylan, France). Serum levels of IL-6 were detected by a “sandwich” ELISA test (Quantikine HS, R&D System, MN, USA) and serum levels of pro-hepcidin were measured by a competitive ELISA test (DRG Instruments, Germany).

2.4- Criteria adopted for definition and classification of anaemic patients

Value of haemoglobin (Hb) lower than 12 g/dl was indicative of anaemia [11,12]. Iron deficiency anaemia (IDA) patients presented SI concentration ≤ 50 $\mu\text{g/dl}$ for men and ≤ 40 $\mu\text{g/dl}$ for women, transferrin saturation (TS) $< 15\%$, SF concentration ≤ 50 ng/ml. Patients showing hypoferrremia (SI ≤ 50 $\mu\text{g/dl}$ for men and ≤ 40 $\mu\text{g/dl}$ for women) and SF ≥ 100 ng/ml were classified as ACD patients. Patients classified in none of the above categories, and without evidences of haemolysis, bleeding or megaloblastic anaemia were defined as presenting anaemia related to cancer (ARC).

Statistical analysis

All the data collected were stored and analyzed using version 8.02 of the SAS for Windows software package (SAS Inc., Cary, NC, USA). Data are represented as median and range. The significance of difference among groups was determined using Kruskal-Wallis test and correlations between parameters were tested using Spearman correlation coefficient. A p-value < 0.05 was considered statistically different.

3. Results

3.1- Evaluation of anaemia

Table 2 summarises haematological and iron metabolism parameters found in patients enrolled in study. Twenty-four out of 105 individuals with anaemia (22.8%) presented IDA, 29 patients (27.6%) presented ACD and 52 patients (49.5%) presented ARC. Seven patients with IDA showed MCV values > 80 fl, 5 patients with ARC and 2 with ADC presented MCV > 99 fl. Serum folate and serum B12 measurements and reticulocyte counts showed values within normal range (3.2 – 9.0 ng/ml, 202 – 900 pg/ml and 50 – 100 $\times 10^9/l$, respectively), except one IDA patient, who presented an associated B12 deficiency (serum B12= 179 pg/ml).

The degree of anaemia and EPO response were similar among anaemic groups. Although reticulocyte counts had been similar, RET-Y values were significantly lower in IDA group than in NoA and ARC groups. ACD patients showed lower RET-Y values than ARC patients. There was not difference between IDA and ACD groups.

sTfR levels and sTfR/log ferritin were significantly higher in IDA than in the other types of anaemia and in NoA patients. There was no difference in SF levels between ACD and ARC groups. NoA patients showed SF levels significantly lower than ACD patients, but similar to patients with ARC (Table2).

3.2. Serum levels of inflammatory markers

Significantly higher values of CRP, IL-6 and ESR were observed in ACD patients group compared to IDA, ARC and NoA groups. No difference was observed when IDA, ARC and NoA were compared. Serum levels of pro-hepcidin were not different among all studied groups ($p= 0.138$) (Table 3 and Figure 1).

IL-6 was significantly higher in anaemic patients with $CRP \geq 0.5$ mg/dl (median= 10.18, range 1.42 – 249.3) than in patients with $CRP < 0.5$ mg/dl (median= 3.22, range 0 – 57.4). Among ARC, IDA and NoA groups with $CRP < 0.5$ mg/dl, IL-6 levels were not different ($p= 0.113$). In patients with $CRP \geq 0.5$ ng/ml, higher IL-6 levels were observed in ACD group than in ARC and NoA patients ($p= 0.002$ and $p= 0.0001$, respectively). IDA group with $CRP \geq 0.5$ ng/ml showed higher IL-6 levels when compared with NoA patients ($p= 0.027$).

There was not a difference in hepcidin levels between groups with $CRP \geq 0.5$ and < 0.5 mg/dl.

3.3. Correlation between inflammatory activity and anaemia

The possible influence of inflammatory activity on Hb levels was observed only in ACD group, represented by an inverse correlation between SF and Hb levels ($r= - 0.63$, $p= 0.0003$), CRP and Hb levels ($r= -0.46$, $p= 0.012$), IL-6 and Hb levels ($r= - 0.61$, $p= 0.0005$) and ESR and Hb levels ($r= - 0.46$, $p= 0.020$). In addition, there was a weak correlation between EPO and IL-6 levels ($r= 0.40$, $p= 0.034$) and between EPO and CRP levels ($r= 0.52$, $p= 0.005$). For the remaining anaemic groups the correlations were not significant. Pro-hepcidin levels were not correlated with anaemia degree in any group.

3.4. Correlation between inflammatory activity and iron metabolism

The correlation among IL-6, CRP, ESR and pro-hepcidin values and SF, sTfR and SI levels was tested, in order to verify the possible action of inflammatory activity on iron metabolism. According to Spearman correlation test results all inflammatory markers presented positive correlation only with SF in ACD group (SF X CRP: $r= 0.58$, $p= 0.009$; SF X ESR: $r= 0.49$, $p= 0.013$; SF X IL-6: $r= 0.39$, $p= 0.038$, and SF X pro-hepcidin: $r= 0.41$, $p= 0.032$). In IDA group positive correlations were significant between SF and CRP ($r= 0.49$, $p= 0.026$), SF and ESR ($r= 0.61$, $p= 0.005$) and SF and IL-6 ($r= 0.59$, $p= 0.003$). ARC group showed positive correlation between SF and CRP ($r= 0.4717$, $p= 0.0005$), and SF and ESR ($r= 0.42$, $p= 0.005$).

A significant correlation was observed between CRP and IL-6 levels in all anaemic groups: $r= 0.40$, $p= 0.008$ for ARC, $r= 0.74$, $p= 0.0001$ for ACD and $r= 0.77$, $p< 0.0001$ for IDA group. Such correlation was not significant in non anaemic patients ($r= 0.24$, $p= 0.280$).

4. Discussion

The definition of anaemia in patients with cancer is not homogeneous in the literature. Values of Hb $\leq 11.2 - 12.0$ g/dl in females and $\leq 13.0 - 13.5$ g/dl in males have been used as indicative of anaemia in those patients [13, 14]. The World Health Organization defines anaemia as Hb < 10.9 g/dl [15]. We adopted the haemoglobin value lower than 12 g/dl as indicative of anaemia [11, 12].

ACD, the most common form of anaemia in cancer patients, is typically a hypoproliferative anaemia consequent to the iron-restricted erythropoiesis due to a diversion of iron traffic from the circulation to store sites. Our results showing RET-Y values lower in IDA and ACD groups than in NoA and ARC indicate the impaired offer of iron to erythropoiesis, as previously reported [15].

Pro-inflammatory cytokines induce anaemia by inhibition of erythroid progenitor cells proliferation, one of the pathophysiological mechanisms underlying ACD [16]. Besides, cytokines inhibit hypoxia-induced EPO production, affect the life span of

mature erythrocytes and impair iron metabolism [reviewed in 17]. In our study we could observe the possible role of inflammatory condition on the pathophysiology of ACD in patients with cancer, as CRP, IL-6 and ESR values were significantly higher in ACD group than in other types of anaemia. The relationship between CRP and IL-6 has been demonstrated in the present study and it was more evident when patients were classified according to CRP values. IL-6 levels were significantly higher in groups showing abnormally elevated CRP values, suggesting the action of elevated levels of IL-6 on CRP production in cancer patients.

It was observed an inverse correlation between Hb levels and inflammatory markers only in ACD group. In addition, IL-6 and CRP showed a weak correlation with EPO levels. The action of IL-6 on synthesis of EPO is conflicting, as IL-6 increases EPO production in hepatocytes and reduces in kidney [17]. Overall, the plasma level of EPO in patients with infectious, inflammatory and neoplasia disorders is often low in relation to the blood Hb concentration.

We tested the correlation between inflammatory activity and iron metabolism and the single correlation observed was between SF and CRP, IL-6 and ESR, for all anaemic groups. Although SF is considered a parameter indicative of iron stores, it is also an acute-phase protein and levels are increased due to immune activation in several inflammatory conditions [18]. Thus, these positive correlations were expected.

IL-6 has an important role in iron homeostasis. It is the main inducer of hepcidin formation and its active form acts by inhibiting the duodenal iron absorption and blocking iron release from macrophages/monocytes by the interaction and degradation of ferroportin, an iron exporter expressed on the basolateral membrane of enterocytes [7, 19]. The effects of inflammation on hepcidin mRNA expression have been investigated mainly by urinary hepcidin excretion analysis [20, 21]. The determination of pro-hepcidin levels in serum by using an ELISA assay has been reported recently. Pro-hepcidin consists of 60 aa (aa 25-84) and corresponds to the sequence after cleavage of the signal peptide (aa 1-24) from hepcidin precursor. ELISA test is based on the competitive principle using polyclonal rabbit antibody against the N terminal region (aa 28-47) of pro-hepcidin [22]. As to our knowledge, determination of serum pro-hepcidin in cancer patients has not been previously

reported. Serum pro-hepcidin levels were not different among anaemic groups, between patients with and without anaemia, and when patients with neoplasia were compared with a group of healthy individuals (data not shown). Differently from other inflammatory markers, pro-hepcidin levels were not correlated with Hb levels in ACD group. Although IL-6 is the main inducer of hepcidin a correlation between them was not observed.

Dallalio et al [23] measured serum hepcidin by western blot assay and suggested that serum or urine hepcidin may be primarily associated with the regulation of ferritin production, rather than being an actual mediator of ACD. Our results are in accordance with that suggestion, as the serum pro-hepcidin concentration shows a statistically significant correlation with SF in ACD group.

It has been questioned the possibility that the functional N terminal antibody used for serum analyses represents non-functional precursor amino acids and not the active molecule [24] and that urinary hepcidin determination might be the most accurate measure because corresponds to a “free” form of hepcidin, on the contrary to the carrier – bound form probably detected by the antibody used in the serum hepcidin assay [8].

According to our results we could conclude that inflammatory factors are more related to the onset of ACD than of ARC, as higher levels of inflammatory markers have been observed in ACD than in ARC patients. The inflammatory condition probably contributes to ferritin increasing, reducing iron availability for erythropoiesis in ACD.

In this study it was no possible to demonstrate the relationship between hepcidin levels and degree of anaemia in cancer patients, as well as it was not verified the possible role of hepcidin in the pathogenesis of ACD. Considering that the anaemia in cancer patients is multifactorial, other studies will be necessary to understand the contribution of different processes to impair iron regulation and erythropoiesis involved in the development of ACD.

Acknowledgements: We are grateful to Prof. Maria Heloisa S L Blotta for offering the use of her laboratory, to Ms Carmem A C Aguiar and Ms Laurione C de Oliveira for technical assistance, and to Ms. Andrea Semolini for statistical analyses. Grant Sponsors: FAPESP, nº 08733-8/2004 and FAEP/UNICAMP nº 369/04.

References

- 1 Harrison L et al. Prevalence of anemia in cancer patients undergoing radiation therapy. *Semin Oncol* 2001; 28: 54-59.
- 2 Ludwig H, Fritz E. Anemia in cancer patients. *Semin Oncol* 1998; 25: 2-6.
- 3 Weiss G, Goodnough LT. Medical progress: anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352: 1011-1023.
- 4 Clarke H, Pallister CJ. The impact of anaemia on outcome in cancer. *Clin Lab Haematol* 2005; 27: 1-13.
- 5 Nemeth E et al. IL-6 mediates hypoferraemia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone Heparidin. *J Clin Invest* 2004; 113: 1271-1276.
- 6 Macciò A et al. Hemoglobin levels correlate with interleukin-6 levels in patients with advanced untreated ovarian cancer: role of inflammation in cancer-related anemia. *Blood* 2005; 106: 362-367.
- 7 Ganz T. Heparidin – a regulator of intestinal iron absorption and iron recycling by macrophages. *Best Pract Res Clin Haematol* 2005; 18: 171-182.
- 8 Means Jr RT. Heparidin and anaemia. *Blood Rev* 2004; 18: 219-225.
- 9 Dallalio G, Law E, Means Jr RT. Heparidin inhibits in vitro erythroid colony formation at reduced erythropoietin concentrations. *Blood* 2006; 107: 2701-2704.
- 10 Hinzmann R. Iron metabolism, iron deficiency and anaemia. *Sysmex J Internat* 2003; 13: 65-74.
- 11 Theurl I et al. Dysregulated monocytes iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood* 2006; 107: 4142-4148.
- 12 Thomas C, Thomas L. Anemia of chronic disease: pathophysiology and laboratory diagnosis. *Lab Hematol* 2005; 11: 14-23.
- 13 Sweeney PJ et al. Effect of subcutaneous recombinant human erythropoietin in cancer patients receiving radiotherapy: final report of a randomised, open-labelled, phase II trials. *Br J Cancer* 1998; 77: 1996-2002.

- 14 Bokemeyer C, Foubert J. Anemia impact and management: focus on patients needs and the use of erythropoietic agents. *Semin Oncol* 2004; 31: 4-11.
- 15 Noronha JFA, Grotto HZW. Measurement of reticulocyte and red blood cell indices in patients with iron deficiency and β -thalassemia minor. *Clin Chem Lab Med* 2005; 43: 195-197.
- 16 Fuchs D, Zangerle R, Denz H, Wachter H. Inhibitory cytokines in patients with Anemia of Chronic Disorders. *Ann NY Acad Sci* 1994; 718: 344-346.
- 17 Jelkmann W. Proinflammatory cytokins lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 555-559.
- 18 Torti FM, Torti SV. Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 2002; 99: 3505-3516.
- 19 Nemeth E et al. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306: 2090-2093.
- 20 Nemeth E et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101: 2461-2463.
- 21 Détiavaud L et al. Hepcidin levels in human are correlated with hepatic iron stores, hemoglobin levels, and hepatic function. *Blood* 2005; 106: 756-748.
- 22 Kulaksiz H et al. Pro-hepcidin: expression and cell specific localization in the liver and its regulation in hereditary haemochromatosis, chronic renal insufficiency, and renal anaemia. *Gut* 2004; 53: 735-743.
- 23 Dallalio G, Fleury T, Means Jr RT. Serum Hepcidin in clinical specimens. *Br J Haematol* 2003; 122: 996-1000.
- 24 Brookes MJ, Sharma NK, Tselepis C, Iqbal TH. Serum pro-hepcidin: measuring active Hepcidin or a non-functional precursor? *Gut* 2005; 54: 169-170.

Table1: Clinical characteristics of cancer patients enrolled in study. Patients with neoplasia and anaemia

Tumor types	Patients with neoplasia and anaemia Males= 51; Females= 54 Median 60 years (30-88) *					Patients with neoplasia without anaemia Males= 16; Females= 14 Median 56 years (35-80)				
	n	Therapy			No	n	Therapy			No
		R	C	R+C			R	C	R+T	
Lung	12		10	2		5		3	2	
Head and neck	16		7	7	2	3			3	
Breast	10		5		5	3		2	1	
Gastrointestinal	52	1	29	12	10	13	1	9	1	2
Genitourinary	6	1	3	1	1	2	2			
Gynecologic	6	1	4		1	2	1		1	
Skin	0					1		1		
Bone	2	1	1							
Other tumors	1		1			1				1
Total	105	4	60	22	19	30	4	15	8	3

There was not significant difference related to age and gender between groups of patients with and without anaemia. R: radiotherapy; C: chemotherapy; No: without treatment when the sample blood was collected.

Table 2: Values for haematimetric and iron-metabolism parameters measured in 105 patients with cancer and anaemia and 30 patients with cancer without anaemia. Values are expressed in median and range (minimum and maximum)

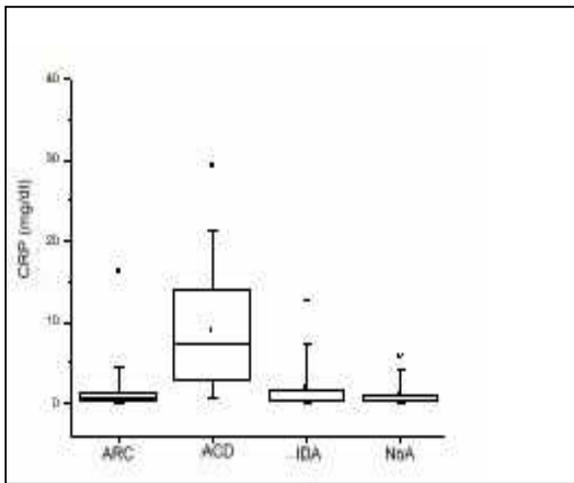
	IDA (n= 24)	ACD (n= 29)	ARC (n=52)	NoA (n= 30)	p= 0.0001
Hb (g/dl)	10.7 (8.5-11.8)	10.4 (8.0-11.9)	11.0 (7.6-11.9)	13.6 (12.0-16.0)	NoAxARC, NoAxIDA, NoAxACD
MCV (fl)	79.8 (66.5-93.1)	85.9 (76.7-101.9)	91.7 (72.2-115.5)	92.4 (81.3-99.1)	NoAxACD, NoAxIDA, ARCxACD, ARCxIDA
MCH (pg)	25.1 (19.4-30.0)	27.8 (24.0-32.6)	30.0 (26.5-34.3)	30.3 (26.5-34.3)	NoAxADC, NoxIDA, ARCxACD, ARCxIDA
RDW (%)	17.3 (14.8-21.9)	15.8 (13.1-19.2)	16.1 (12.7-19.8)	14.3 (12.8-17.6)	ACDxIDA, IDAxNoA, ARCxNoA, ACDxNoA
RET# (x10 ⁹ /l)	56.4 (11.0-113.1)	51.3 (11.0-79.0)	58.0 (13.0-100.1)	62.8 (36.9-98.9)	NS
RET-Y	1677 (1359-1930)	1759 (1552-1939)	1929 (1775-2146)	1903 (1794-2006)	NoAxACD, NoAxIDA, ACDxARC, IDAxARC
EPO (mIU/ml)	37.0 (12.8-94.6)	27.0 (9.4-241)	26.3 (6.6-880)*	15.3 (7.1-36.9)	NoAxACD, NoAxIDA
SI (mg/dl)	41.0 (21.0-77.0)	32.0 (11.0-51.0)	72.0 (44.0-323.0)	77.0 (42.0-245.0)	NoAxIDA, NoAxACD, ARCxIDA, ARCxACD
TIBC (mg/dl)	421.5 (264.0-575.0)	229.0 (112.0-377.0)	281.0 (180.0-458.0)	348.0 (219.0-551.0)	IDAxARC, IDAxACD, NoAxARC, NoAxACD, ARCxACD
TS (%)	9.8 (4.6-17.3)	12.8 (6.1-26.7)	24.8 (15.6-103.7)	22.2 (10.34-90.0)	ARCxACD, ARCxIDA, NoAxACD, NoAxIDA
sTfR (mg/l)	2.43 (1.14-8.51)	1.66 (0.13-3.49)	1.66 (0.73-4.12)	1.51 (0.73-2.38)	IDAxARC, IDAxACD, IDAxNoA
sTfR/logSF	1.58 (0.93-11.66)	0.63 (0.06-1.16)	0.72 (0.24-1.43)	0.74 (0.35-1.36)	IDAx NoA, IDAxARC, IDAxACD
SF (ng/ml)	18.5 (2.8-128.6)	339.8 (62.5-2646.0)	200.1 (50.0-1545.0)	171.2 (37.8-1179.0)	ACDxNoA, ACDxIDA, ARCxIDA, NoAxIDA

NS: not significant. IDA: iron deficiency anaemia; ACD: anaemia of chronic diseases; ARC: anaemia related to cancer; NoA: patients without anaemia; Hb: haemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; RET #: absolute number of reticulocytes; SI: serum iron; TIBC: total iron-binding capacity; TS: transferrin saturation; sTfR: soluble transferrin receptor; SF: serum ferritin. *EPO= 880 mIU/ml corresponds to a patient with ovarian cancer, probably an EPO secreting tumour

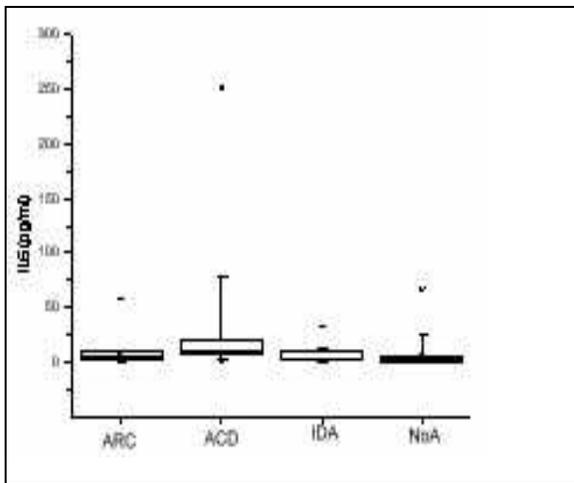
Table 3: Values for the inflammatory markers measured in 105 patients with cancer and anaemia, and 30 patients with cancer without anaemia.

	IDA (n= 24)	ACD (n=29)	ARC (n= 52)	NoA (n=30)	p-value *
CRP (mg/dl)	0.41 (0.02-12.60)	7.36 (0.49-29.30)	0.70 (0.02-16.30)	0.33 (0.02-5.72)	< 0.001
ESR (mm)	60.0 (20.0-130.0)	126.5 (57.0-449.0)	84.5 (12.0-134.0)	47.5 (4.0-131.0)	< 0.01
IL-6 (pg/ml)	3.79 (0.80-32.10)	10.77 (1.14-249.30)	6.63 (0.0-57.4)	2.85 (0.0-1930.20)	<0.005
Pro-hepcidin (ng/ml)	210.1 (57.1-386.0)	255.9 (96.0-479.0)	261.5 (138.8- 1222.0)	230.9 (109.8-847.0)	0.1384

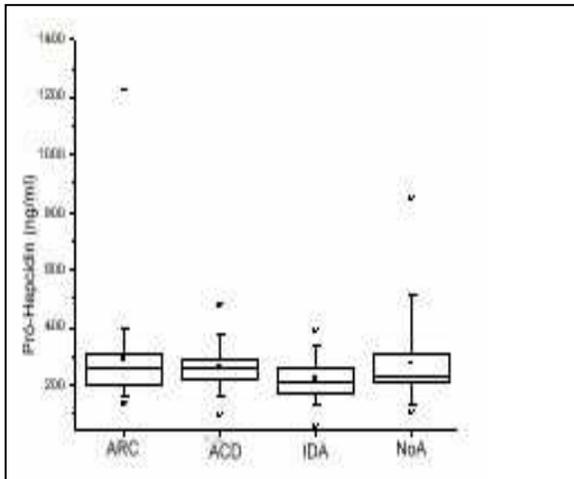
*p-values when ACD group was compared with IDA, ARC and NoA. There was not difference when the other groups were compared. IDA: iron deficiency anaemia; ACD: anaemia of chronic diseases; ARC: anaemia related to cancer; NoA: patients without anaemia; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; IL-6: interleukin-6



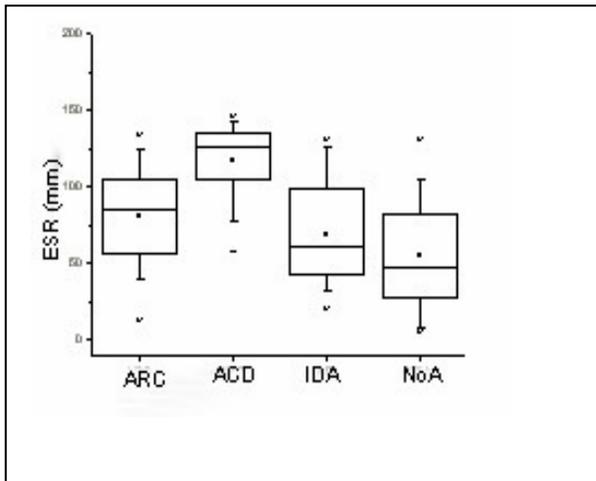
A



B



C



D

Figure 1: Box- plot showing distribution of CRP (A), IL-6 (B), pro-hepcidin (C) and ESR (D) in ARC, ACD, IDA and NoA groups. The vertical lines indicates the range of values – excluding occasional “outliers”

(x)– the boxes indicate interquartile ranges and the horizontal lines indicates medians. The arithmetic means values are also indicated (□).

IDA: iron deficiency anaemia; ACD: anaemia of chronic diseases; ARC: anaemia related to cancer; NoA: patients without anaemia; CRP: C-reactive protein; ESR: erythrocyte sedimentation rate; IL-6: interleukin-6