

**Kleber Yotsumoto Fertrin**

**ASPECTOS DA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO NAS  
HEMOGLOBINOPATIAS**



**Campinas**

**2011**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**

**Faculdade de Ciências Médicas**

**ASPECTOS DA REGULAÇÃO DO METABOLISMO DO FERRO NAS  
HEMOGLOBINOPATIAS**

**Kleber Yotsumoto Fertrin**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Fisiopatologia Médica, área de concentração Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento. Sob orientação do Prof. Dr. Fernando Ferreira Costa.

Campinas

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
UNICAMP

F418a Fertrin, Kleber Yotsumoto, 1980 -  
Aspectos da regulação do metabolismo do ferro nas  
hemoglobinopatias. / Kleber Yotsumoto Fertrin. --  
Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador: Fernando Ferreira Costa  
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de  
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Talassemia beta. 2. Anemia Falciforme. 3.  
Eritropoese. 4. Ferro. 5. Fator 15 de diferenciação de  
crescimento. I. Costa, Fernando Ferreira. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em inglês:** Aspects of iron metabolism regulation in hemoglobinopathies

**Palavra-chave em inglês:**

Beta thalassemia

Sickle cell anemia

Erythropoiesis

Iron

Growth differentiation factor 15

**Área de concentração:** Biologia Estrutural, Celular, Molecular e do Desenvolvimento

**Titulação:** Doutor em Fisiopatologia Médica

**Banca examinadora:**

Fernando Ferreira Costa [Orientador]

Rodolfo Delfini Cançado

Helena Zerlotti Wolff Grotto

Erich Vinicius de Paula

Maria Stella Figueiredo

**Data da defesa:** 19-09-2011

**Programa de Pós-Graduação:** Faculdade de Ciências Médicas

---

## Banca examinadora da tese de Doutorado

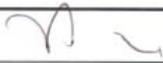
Kleber Yotsumoto Fertrin

---

---

Orientador(a) : Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

---



---

### Membros:

---

1. Prof(a). Dr(a). Fernando Ferreira Costa

---

2. Prof(a). Dr(a). Rodolfo Delfini Cançado

---

3. Prof(a). Dr(a). Helena Zerlotti Wolff Grotto

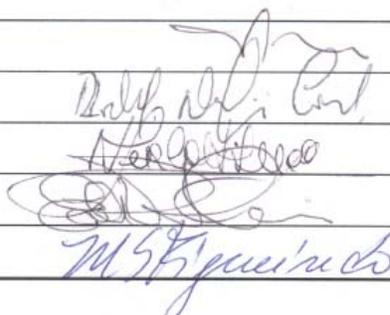
---

4. Prof(a). Dr(a). Erich Vinicius de Paula

---

5. Prof(a). Dr(a). Maria Stella Figueiredo

---



Curso de pós-graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da  
Universidade Estadual de Campinas.

---

Data: 19/09/2011

---



## AGRADECIMENTOS

---

Há muitos a quem agradecer, e talvez seja impossível retribuir a todos nominalmente, mas agradeço, em especial, aos pacientes que sempre foram a motivação dos meus estudos.

Alguns agradecimentos especiais:

Ao Dr. Fernando Ferreira Costa, por ter me oferecido a oportunidade de entrar no mundo da Hematologia, por ter avistado que havia em mim um curioso cientista em potencial, por todo o apoio, pela verdadeira orientação, muitíssimo obrigado;

À Dra. Joyce Annichino-Bizzacchi, ao Dr. Rodolfo Cançado, à Dra. Maria Stella Figueiredo e ao Dr. Erich de Paula, por suas contribuições nas bancas de qualificação e de defesa;

À Dra. Helena Grotto, pela disponibilidade em participar da qualificação e defesa, e pelo apoio do Laboratório de Patologia Clínica aos meus estudos;

À Dra. Nicola Conran, não apenas por sua participação na qualificação de tese, mas pelo privilégio de trabalhar no dia-a-dia a seu lado;

A todos da Fundação HEMOPE que colaboraram para essa tese, em especial ao Dr. Aderson, sempre disponível;

À Carol, porque, sem ela, essa tese não teria sido possível, pela paciência e ensinamentos, e sobretudo pela amizade (ah, e bancada, pipetas, ponteiras, eppendorfs, viagens, compras...);

À Dul, pela eterna disposição a ajudar, ensinar, pelas conversas ao pé da cafeteira, e pelo esforço ininterrupto em não deixar que os experimentos parem;

À Carla, pela ajuda na bancada e fora dela, amizade e companheirismo (e por, junto com a Carol e a Dul, terem proporcionado minha “iniciação científica” na “patofisiologia” da vida);

Ao Marcos André (ah é, Prof. Dr.!), sem cuja ajuda esta tese também não existiria, pela amizade, colaboração, e por ter viabilizado a “ponte Recife-Campinas”;

À Flávia Pallis (“Frávia!”) por sua disposição de organizar as coletas de amostras no laboratório, pelo trabalho lado a lado na bancada, pela companhia;



À Flávia “Boca”, por tornar a vida em laboratório mais feliz, pela ajuda nas ideias, às vezes, improváveis ou repentinas, e pela amizade;

A todos os amigos que fiz no (e por conta do) laboratório: Mari, Mário, Marcus, Andrey, Pati, Dani, Ucha, Magnun, Manel, Ana Leda, Irene, Simone, Lena, Pedro, Dil, Dri, Ana Flávia, Tati, Renata, Vanessa, Regiane, Diana, Venina, Emília, Lediana, Cíntia, Sheley, Camila, Fernanda, Andréia, Mônica e Anderson, que compõem uma verdadeira família que me recebeu;

A todos do Ambulatório de Hematologia, agendamento, recepção, coleta, serviço social, equipe de enfermagem e médicos do Ambulatório de Hematologia, por contribuírem direta ou indiretamente, em especial à Profa. Dra. Sara Olalla Saad, Márcia, Brunna, Fernando e Marina e, claro, aos médicos residentes desses anos que se passaram;

À Elisete, por toda e qualquer papelada, e-mail ou reunião agendada, a qualquer hora do dia e até tarde da noite;

À Patrícia e Raquel, pela prestatividade em me auxiliar sempre que precisei;

Ao pessoal dos laboratórios, principalmente à Fernanda, Suiellen, Rosângela e Felipe (Lab. Marcadores Celulares) e à Mônica e Lili (Hematologia);

À Arlete e Leonardo do Apoio Didático, por tantos pôsteres, apresentações, e mesmo esta tese;

Aos meus amigos da vida “extra-hematológica”, Carol, Leandro, Ju, Anna e Lu (e muitos outros...), por me ajudarem a manter a sanidade mental;

A minha família, pelo apoio incondicional a meus planos profissionais, fundamental para que eu pudesse chegar até aqui;

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro;

A todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para essa tese.



*“DER BLUT IST EIN GANZ BESONDERER  
SAFT.”*

*“O SANGUE É UM FLUIDO MUITO ESPECIAL.”*

**Johann Wolfgang Goethe (1749-1832)**



## RESUMO

---

As hemoglobinopatias são distúrbios hereditários em que uma mutação genética leva a alteração da produção normal de hemoglobina, tal como na anemia falciforme e nas talassemias  $\beta$ . Na maioria dessas doenças, ocorre anemia com necessidade transfusional variável, o que pode acarretar sobrecarga corporal de ferro. Na talassemia  $\beta$  intermediária, ocorre aumento espontâneo e desproporcional da absorção do ferro, com consequente excesso desse metal mesmo na ausência de transfusões. Com a evolução da terapia transfusional e o aumento da expectativa de vida desses pacientes, o conhecimento sobre a regulação do metabolismo do ferro tornou-se fundamental para melhor controle da sobrecarga de ferro. O principal regulador desse metabolismo é a hepcidina, um polipeptídeo produzido majoritariamente pelo fígado, porém também sintetizado por células do sistema fagocítico-mononuclear, em que seu papel é pouco conhecido. Uma citocina capaz de suprimir a produção de hepcidina é o GDF-15 (fator de crescimento e diferenciação 15). Neste estudo, com a avaliação de amostras de sangue de 103 pacientes com anemia falciforme, talassemia  $\beta$  intermediária, anemia por deficiência de cobalamina ou outros tipos de anemia, constatou-se que o aumento dos níveis desse fator ocorre tanto em quadros de hemólise crônica quanto na presença de eritropoese ineficaz, constituindo um sinal da medula óssea modulador da absorção de ferro nos estados de aumento da eritropoese. Entretanto, evidenciou-se que a associação de supressão da hepcidina com altos níveis de GDF-15 ocorre nas hemoglobinopatias, mas não nas demais causas de anemia. Na anemia megaloblástica, a ausência de sobrecarga de ferro com níveis normais de hepcidina ao diagnóstico e sua queda durante o tratamento sugerem regulação da hepcidina independente de GDF-15 neste tipo de anemia. A análise da razão hepcidina/ferritina mostrou-se mais fidedigna que os níveis de hepcidina circulante na identificação dos estados em que há propensão a absorção aumentada de ferro por alta atividade eritropoética, e sugerem que o estado inflamatório crônico da anemia falciforme poderia exercer um fator protetor contra sobrecarga de ferro, quando comparados a talassemia intermediária, pela elevação relativa da produção de hepcidina. Além disso,



observou-se uma correlação negativa entre a expressão gênica de hepcidina (gene *HAMP*) em monócitos humanos e os níveis de GDF-15, denotando um provável efeito regulatório

semelhante ao descrito em hepatócitos. Não se identificou correlação entre essa expressão nos monócitos e marcadores de sobrecarga de ferro, corroborando a hipótese de a hepcidina ter outra função nessas células, não relacionada diretamente à absorção de ferro. Pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia apresentaram maiores níveis de expressão de hepcidina monocítica e obteve-se evidência *in vitro* de uma ação estimuladora dessa expressão por esse fármaco, caracterizando a hidroxiureia com potencial atividade agonista de hepcidina, de futuro interesse em estudos de sua aplicação clínica nos estados em que exista deficiência monocítica dessa proteína. Trata-se do primeiro estudo avaliando comparativamente hemoglobinopatias e outros tipos de anemia com e sem componente eritropoético ineficaz do ponto de vista dos reguladores da absorção de ferro, além de caracterizar, pela primeira vez, a expressão de hepcidina extra-hepática nos distúrbios da síntese de hemoglobina.



## ABSTRACT

---

Hemoglobinopathies are inherited diseases in which a genetic mutation leads to abnormal production of hemoglobin, such as in sickle cell anemia or in the  $\beta$ -thalassemias. In the majority of these disorders, anemia causes variable degrees of transfusion dependency, which may lead to iron overload. In  $\beta$ -thalassemia intermedia, an increase in iron absorption occurs spontaneously and regardless from the total body iron stores, generating iron overload even in the absence of repeated transfusions. Owing to advances in transfusion medicine and to the improvement in the overall life expectancy of patients with hemoglobin disorders, further knowledge on the regulation of iron metabolism has become increasingly important for appropriate management of iron overload. The main regulator of iron metabolism is hepcidin, a polypeptide mainly produced by the liver, although its synthesis also occurs in phagocytic-mononuclear cells, in which its role is less known. Growth differentiation factor 15 (GDF-15) is a cytokine capable of downregulating hepcidin production. This study analyzed 103 blood samples from patients with sickle cell anemia,  $\beta$ -thalassemia intermedia, cobalamin deficiency anemia and other types of anemia, showing elevation of GDF-15 plasmatic levels both in chronic hemolytic states and ineffective erythropoiesis, thus characterizing it as a signalling molecule produced by the bone marrow to stimulate iron absorption in the presence of increased erythropoietic activity. Nevertheless, hepcidin suppression was only associated with high levels of GDF-15 in the hemoglobinopathies. In megaloblastic anemia, absence of iron overload with normal hepcidin levels, associated with their reduction during treatment, suggest that hepcidin regulation occurs independently from GDF-15 in this type of anemia. Analysis of hepcidin/ferritin ratio proved to be more reliable to identify patients prone to increased iron absorption due to erythropoietic hyperactivity than hepcidin levels themselves and suggests that the chronic inflammatory state in sickle cell anemia may protect from iron overload by relatively increasing hepcidin levels in comparison to levels found in thalassemia intermedia. Moreover, we found a negative correlation between GDF-15 levels and *HAMP* monocytic expression, a regulatory mechanism similar to what has been observed in hepatic cell lines. In further analyses of the present study, no correlation between hepcidin



expression and iron overload markers was observed in monocytes from patients with hemoglobinopathies, corroborating the hypothesis that the monocytic counterpart of hepcidin could have a different function, unrelated to iron regulation. Patients with sickle cell anemia under hydroxyurea treatment have been shown to present with higher levels of hepcidin expression in monocytes, and a cell culture model managed to demonstrate the upregulating effect of hydroxyurea *in vitro*, thus highlighting the possibility of exploring this drug in the future as a potential hepcidin agonist and, therefore, as a therapeutic intervention in diseases with impaired monocytic hepcidin production. This is the first study of molecules involved in iron metabolism regulation comparing hemoglobinopathies and other anemia types with and without ineffective erythropoiesis. Furthermore, this is the first characterization of extra-hepatic hepcidin expression in hemoglobin disorders.



## LISTA DE ABREVIATURAS

---

ANOVA	análise de variância ( <i>analysis of variance</i> )
BMP	proteína morfogenética óssea ( <i>bone morphogenetic protein</i> )
CTRL	indivíduos controle
CEBP $\alpha$	CCAAT/ <i>enhancer binding protein</i> (C/EBP), $\alpha$
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH	concentrado de hemácias
CNS	Conselho Nacional de Saúde
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
DMT1	transportador divalente de metais 1
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxirribonucleotídeos
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>
EPM	erro padrão da media
EPO-R	receptor de eritropoetina
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe	ferro
GAPDH	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDF-15	fator de crescimento e diferenciação 15
Hb	hemoglobina
HCV	vírus da hepatite C
HIF-1	<i>hypoxia inducible factor 1</i>
HMG	hemograma
HO-1	heme oxigenase 1
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
HRE	<i>hypoxia responsive element</i> – elemento responsivo a hipóxia
Ht	hematócrito



HU	hidroxiureia
IL-6	interleucina-6
JAK2	janus quinase 2
LPS	lipopolissacarídeo
MALDI-TOF	<i>matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight</i>
MS	Ministério da Saúde
NTBI	ferro não ligado a transferrina ( <i>non transferrin-bound iron</i> )
pb	pares de bases
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (solução salina tamponada com fosfato)
PCR	proteína C reativa
PIGF	<i>placental growth factor</i>
PNTN	Programa Nacional de Triagem Neonatal
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
RNA	ácido ribonucléico
RNA <sub>m</sub>	ácido ribonucleico mensageiro
Sat Tf	saturação de transferrina
SELDI-TOF	<i>surface enhanced laser desorption/ionization – time of flight</i>
SMAD1/5/8	complexo <i>sons of mothers against decapentaplegic</i> homólogos 1, 5 e 8
SMAD4	<i>sons of mothers against decapentaplegic</i> homólogo 4
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
Tf	transferrina
TfR1	receptor de transferrina 1
TfR2	receptor de transferrina 2
TIBC	capacidade total de ligação ao ferro
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
TWSG-1	<i>twisted gastrulation homolog 1</i>
U.A.	unidades arbitrárias de expressão gênica
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VCM	volume corpuscular médio
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>



## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Classificação das formas genéticas de hemocromatose .....	52
Tabela 2 - Sequências dos <i>primers</i> utilizados neste estudo .....	73
Tabela 3 - Dados laboratoriais dos controles, pacientes com talassemia, anemia falciforme sem e com uso de hidroxiureia e estratificados em função do histórico transfusional. 78	
Tabela 4 - Dados laboratoriais dos pacientes diagnosticados com deficiência de cobalamina .....	92
Tabela 5 - Dados laboratoriais dos pacientes com hemólise crônica de outras causas .....	93



## LISTA DE FIGURAS

---

- Figura 1 - Distribuição do ferro no organismo humano. As flechas cheias representam as vias que devolvem o ferro para a circulação sanguínea, e as flechas vazias representam as vias que o retiram da circulação e levam aos órgãos que o utilizam, e as perdas do ferro pelo organismo..... 49
- Figura 2 - Estrutura da hepcidina. Em (A), a sequência de aminoácidos da pré-pro-hepcidina, destacando as três regiões (peptídeo sinalizador, pro-hepcidina e hepcidina madura ou hepcidina-25. Em (B), a sequência de aminoácidos da hepcidina-25, destacando em amarelo os resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto na estrutura terciária (C)..... 54
- Figura 3 - Representação esquemática simplificada dos ligantes BMP, IL-6, LPS e GDF-15, seus receptores e vias de sinalização que regulam a transcrição do gene *HAMP*, que codifica a hepcidina..... 57
- Figura 4 - Níveis plasmáticos de GDF-15 em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20), anemia falciforme sem hidroxiureia não politransfundido (SS-N, n=22), sem hidroxiureia politransfundido (SS-T, n=14) e com hidroxiureia (SSHU, n=17), \*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas, percentis 25 e 75, máximos e mínimos..... 79
- Figura 5 - Níveis de pro-hepcidina plasmática em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20), anemia falciforme sem hidroxiureia não politransfundido (SS-N, n=22), sem hidroxiureia politransfundido (SS-T, n=14) e com hidroxiureia (SSHU, n=17) \*p=0.0012 (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas e percentis 25 e 75, sendo os pontos destacados os valores acima do percentil 95 ou abaixo do percentil 5..... 80
- Figura 6 - Níveis séricos de hepcidina em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20) e anemia falciforme divididos por subgrupo (SS-N, n=22, SS-T, n=14, SSHU, n=17), \*p=0.030 (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas e percentis 25 e 75, sendo os pontos destacados os valores acima do percentil 95 ou abaixo do percentil 5..... 80



Figura 7 - Níveis séricos de IL-6 em controles (CTRL, n=11), pacientes com anemia falciforme (SS, n=50) e talassemia intermediária (TI, n=20), *p=0.0474 (ANOVA e Dunnett).....	81
Figura 8 - Níveis séricos de IL-6 em controles (CTRL, n=11), pacientes com anemia falciforme sem hidroxiureia e histórico de até 20 CH (SS-N, n=18), pacientes sem hidroxiureia e histórico de mais de 20 CH (SS-T, n=14) e pacientes em uso de hidroxiureia (SSHU, n=18), *p=0.0283 (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa valores máximos, mínimos, medianas e quartis. ....	82
Figura 9 - Correlação entre níveis de Hb e de GDF-15 plasmático ( $r_s=-0.7511$ , $p<0.0001$ ). .....	83
Figura 10 - Correlação entre níveis de ferritina sérica e de GDF-15 plasmático ( $r_s=0.6301$ , $p<0.0001$ ).....	84
Figura 11 - Níveis de ferritina sérica em pacientes com anemia falciforme sem tratamento com HU, com histórico de transfusão de até 20 (n=22) ou mais de 20 concentrados de hemácias prévios (n=14), p=0.34 (Mann-Whitney). ....	85
Figura 12 - Níveis de saturação de transferrina em pacientes com anemia falciforme sem tratamento com hidroxiureia, com histórico de transfusão de até 20 (SS-N, n=22) ou mais de 20 concentrados de hemácias prévios (SS-T, n=14), *p=0.045 (Mann-Whitney).....	85
Figura 13 - Correlação entre os níveis de ferritina sérica e de proteína C reativa nos pacientes com anemia falciforme (à esquerda, n=53), $p>0.05$ (Spearman) e nos pacientes com talassemia beta intermediária (à direita, n=20), $p=0.0187$ , $r_s=0.5203$ . 86	
Figura 14 - Correlações entre IL-6 plasmática (à esquerda) e ferritina sérica (à direita) com hepcidina sérica (n=73), $p=0.0392$ , $r_s=0.2489$ para IL-6, $p=0.0005$ , $r_s=0.3753$ para ferritina. ....	87
Figura 15 - Correlação entre níveis de desidrogenase láctica (LDH) e hepcidina sérica em pacientes com anemia falciforme, $p=0.002$ , $r_s=0.4444$ .....	87
Figura 16 - Níveis de hemoglobina dos pacientes com deficiência de vitamina B12 durante o estudo, *p=0.0009 (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear $p<0.0001$ ), HMG, hemograma .....	88



Figura 17 - Medida de volume corpuscular médio dos pacientes com deficiência de vitamina B12 durante o estudo, *p=0.0004 (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear p<0.0001), HMG, hemograma.....	89
Figura 18 - Níveis de GDF-15 plasmático dos pacientes com deficiência de B12 durante o estudo, *p<0.0001 (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear p=0.017), HMG, hemograma.....	90
Figura 19 - Níveis de hepcidina plasmática dos pacientes com deficiência de B12 durante o estudo, *p=0.0454 (Repeated measures ANOVA e Bonferroni), HMG, hemograma .	91
Figura 20 - Níveis de GDF-15 plasmático de controles (CTRL, n=14), talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=53), deficiência de cobalamina (Def B12, n=14) e hemólise crônica de outras causas (AH, n=13), *p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). .....	94
Figura 21 - Níveis de hepcidina plasmática de controles (CTRL, n=14), talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=53), deficiência de cobalamina (Def B12, n=14) e hemólise crônica de outras causas (AH, n=13). Dados expressos como valores máximo/mínimo e quartis, *p<0.05, **p<0.001, ***p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). .....	95
Figura 22 - Razão hepcidina/ferritina em controles (n=11), pacientes com anemia falciforme (SS, n=51), pacientes com talassemia intermediária (TI, n=20), e pacientes com anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 (Def B12, n=13), *p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). .....	96
Figura 23 - Razão hepcidina/ferritina em pacientes com anemia falciforme sem hidroxiureia com até 20 transfusões prévias (SS-N, n=19), anemia falciforme sem hidroxiureia com mais de 20 transfusões prévias (SS-T, n=15), anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=17) e talassemia intermediária (TI, n=20), em comparação com controles sem hemoglobinopatia (CTRL, n=11), *p<0.0001 (ANOVA), #p<0.05 (TI vs. SS-N), p>0.05 para os grupos SS entre si (Dunnett). .....	97



- Figura 24 - Razão pro-hepcidina/ferritina em pacientes com talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=33), e anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=15), em comparação com controles sem hemoglobinopatia (CTRL, n=8), \*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). Os pontos pretos representam valores abaixo do percentil 5 ou acima do percentil 95 da população. .... 98
- Figura 25 - Contagem absoluta média de monócitos no sangue periférico de controles (CTRL, n=13) e pacientes com anemia falciforme sem hidroxureia com até 20 transfusões prévias (SS-N, n=18), anemia falciforme sem hidroxureia com mais de 20 transfusões prévias (SS-T, n=17), anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=18) e talassemia intermediária (TI, n=20), \*p<0.001 (ANOVA e Dunnett). .... 99
- Figura 26 - Expressão gênica média de hepcidina (gene *HAMP*) em monócitos no sangue periférico de controles (CTRL, n=13) e pacientes subdivididos por grupo (TI, talassemia intermediária, n=20, SS, anemia falciforme sem uso de hidroxureia, n=35, SSHU, anemia falciforme com hidroxureia, n=18), \*p=0.0209 (Kruskal-Wallis e Dunn). .... 100
- Figura 27 - Correlações entre expressão gênica de hepcidina em monócitos e níveis de ferritina sérica (à esquerda) e saturação de transferrina (à direita) em todos os pacientes (n=73), p>0.05 (Spearman). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica. .... 101
- Figura 28 - Expressão gênica dos genes *TLR4*, *SMAD4* e *STAT3* em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18, p>0.05 (ANOVA). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica. .... 102
- Figura 29 - Expressão gênica de ferroportina (gene *SLC40A1*) em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18, \*p<0.05, \*\*p<0.001 (ANOVA e Dunnett). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica. .... 103
- Figura 30 - Expressão gênica de cadeia leve (gene *FTL*) e cadeia pesada (gene *FTH*) da ferritina em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18, \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica. .... 104



Figura 31 - Expressão gênica de <i>HAMP</i> em culturas de células THP-1 incubadas com concentrações crescentes de hidroxíureia (HU), n=4 para cada grupo, *p=0.03 (teste t pareado). CTRL, cultura com veículo, U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica. ....	105
Figura 32 - Correlação entre níveis de GDF-15 plasmático e expressão gênica de hepcidina em monócitos na população estudada. (p<0.05, r <sub>s</sub> =0.34) .....	106
Figura 33 - Correlação entre níveis de IL-6 plasmática e expressão gênica de hepcidina em monócitos, p=0.678 (Spearman).....	107
Figura 34 - Correlação entre contagem plaquetária e expressão gênica de hepcidina em monócitos de pacientes portadores de anemia falciforme, p=0.0007, r <sub>s</sub> =-0.59. ....	108
Figura 35 - Dosagem de hepcidina plasmática em pacientes com anemia falciforme (SS), S-β-talassemia (S-beta) e hemoglobinopatia SC, em comparação com controles portadores de traço falciforme ou traço de hemoglobina C (CTRL), p>0.05. Desenhado a partir de Kroot et al., 2009. ....	121
Figura 36 - Razão hepcidina/ferritina plasmática em pacientes com anemia falciforme (SS), S-β-talassemia (S-beta) e hemoglobinopatia SC, em comparação com controles portadores de traço falciforme ou traço de hemoglobina C (CTRL), *p=0.0006. Desenhado a partir de Kroot et al., 2009. ....	121



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	45
1.1 Doenças Falciformes .....	45
1.2 Talassemias $\beta$ .....	47
1.3 Importância do ferro no corpo humano e seu metabolismo .....	48
1.4 Causas primárias e secundárias de sobrecarga de ferro.....	51
1.5 Hepcidina e a regulação da absorção do ferro.....	53
1.6 Mecanismos reguladores da produção de hepcidina .....	56
1.7 GDF-15 e hepcidina .....	59
1.8 Hepcidina em monócitos e macrófagos.....	59
1.9 Hemoglobinopatias e hepcidina.....	60
2 Objetivos Gerais .....	65
2.1 Objetivos Específicos .....	65
3 Casuística e Métodos.....	69
3.1 Casuística.....	69
3.2 Aspectos éticos da pesquisa.....	70
3.3 Métodos .....	70
3.3.1 Dados hematológicos e bioquímicos .....	70
3.3.2 Determinação sérica e plasmática de GDF-15, IL-6 e pro-hepcidina .....	71
3.3.3 Determinação sérica e plasmática de hepcidina .....	71
3.3.4 Separação de monócitos de sangue periférico.....	71
3.3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA para PCR em tempo real.....	71
3.3.6 Determinação da Expressão Gênica através da Técnica de PCR em Tempo Real .....	72
3.3.7 Cultura de linhagem celular THP-1.....	74
3.3.8 Análise estatística .....	74
4 RESULTADOS .....	77
4.1 Dados clínicos, bioquímicos e dosagens de GDF-15, pro-hepcidina, hepcidina e IL-6 de pacientes e controles.....	77



4.2	Correlações entre GDF-15 e níveis de hemoglobina e ferritina sérica.....	83
4.3	Análise comparativa dos marcadores de sobrecarga de ferro nos pacientes com anemia falciforme em função do histórico transfusional.....	84
4.4	Correlação entre proteína C reativa sérica e ferritina sérica.....	85
4.5	Estudos de correlação entre níveis de hepcidina sérica, GDF-15 plasmático, IL-6 plasmática, ferritina sérica e desidrogenase láctica sérica.....	86
4.6	Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – dados hematológicos.....	87
4.7	Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – níveis de GDF-15 plasmático.....	89
4.8	Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – níveis de hepcidina plasmática.....	90
4.9	Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – resumo dos dados laboratoriais.....	91
4.10	Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – dados clínico-laboratoriais.....	92
4.11.-	Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – níveis de GDF-15 plasmático.....	93
4.12	Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – níveis de hepcidina plasmática.....	94
4.13.-	Estudo das razões hepcidina/ferritina e pro-hepcidina/ferritina.....	95
4.14	Contagens de monócitos em sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias.....	98
4.15	Expressão do gene <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias.....	99
4.16	Correlações entre níveis de expressão do gene <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de pacientes com hemoglobinopatias, níveis de saturação de transferrina e ferritina sérica.....	100
4.17	Níveis de expressão de genes envolvidos na regulação de expressão de <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias.....	101



4.18 Níveis de expressão do gene <i>SLC40A1</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias.....	102
4.19.- Níveis de expressão dos genes <i>FTL</i> e <i>FTH</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias.....	103
4.20.- Níveis de expressão do gene <i>HAMP</i> em cultura de linhagem celular THP-1 tratada com hidroxiureia.....	104
4.21 Correlação dos níveis de expressão do gene <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com GDF-15 plasmático.....	105
4.22 Correlação dos níveis de expressão do gene <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com IL-6 plasmática.....	106
4.23 Estudos de correlação dos níveis de expressão do gene <i>HAMP</i> em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com dados hematológicos e bioquímicos ...	107
5 DISCUSSÃO.....	111
6 CONCLUSÕES.....	133
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	137



# *Introdução*

---



# 1 INTRODUÇÃO

---

Eritropoese é o processo biológico através do qual ocorre a produção normal de hemácias pela medula óssea. Uma de suas fases fundamentais é a de hemoglobinizacão, em que ocorre o acúmulo progressivo de hemoglobina no interior dos precursores eritroides. A hemoglobina é uma proteína tetramérica composta de quatro cadeias globínicas e quatro grupamentos heme contendo um átomo de ferro cada e, embora sua estrutura possa variar em composicão proteica de acordo com a fase do desenvolvimento humano, sua função primordial é a de transportar gases, como o oxigênio e o dióxido de carbono (Perutz, 1948; Perutz e Lehmann, 1968). Para que possa desempenhar corretamente sua função, é fundamental que as sequências de nucleotídeos nas regiões do DNA que codificam as globinas estejam preservadas, para que sejam sintetizadas cadeias globínicas na correta proporção e capazes de se complexar adequadamente na formação das moléculas de hemoglobina.

As hemoglobinopatias são um grupo de doenças hereditárias em que mutações genéticas levam a anormalidades da produção de hemoglobina. Podem se manifestar principalmente através da produção de uma hemoglobina estruturalmente anômala, como nas doenças falciformes, ou através do desequilíbrio de produção entre as cadeias globínicas, como nas talassemias (Perutz, 2001).

## 1.1 Doenças Falciformes

As doenças falciformes ocorrem frequentemente em indivíduos com ascendência africana, de modo que, pelo perfil étnico da população brasileira, sua incidência varia de 1 em cada 650 a 4 mil nascimentos, dependendo da região (Portal da Saúde – Triagem Neonatal - [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061)). A anemia falciforme, uma das formas mais comuns dessas doenças em nosso meio, é causada pela homozigose para uma mutação de ponto no códon 6 do gene da globina  $\beta$ , que gera a troca de um radical glutamato por uma valina na cadeia polipeptídica. Isso origina a síntese da hemoglobina S,

que caracteriza esse grupo de patologias, pois ela se polimeriza dentro dos eritrócitos em condições de hipóxia ou acidose, levando à deformação dessas células (falcização) e à anemia hemolítica crônica. As hemácias falcizadas também apresentam aumento de suas propriedades adesivas, e a vaso-oclusão nas doenças falciformes sabidamente envolve outros tipos celulares, tais como neutrófilos, monócitos e plaquetas em interação com os eritrócitos e células endoteliais, em um complexo processo gerador de um estado inflamatório crônico.

O único tratamento farmacológico específico para doenças falciformes aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*, órgão regulador de medicamentos dos Estados Unidos) e disponibilizado pelo Sistema Único de Saúde no Brasil é o uso de hidroxiureia (HU) oral. A HU é um quimioterápico inibidor da ribonucleotídeo redutase, e é capaz de induzir a produção de maiores níveis de hemoglobina fetal, levando a menor falcização das hemácias e redução da frequência de crises de vaso-oclusão, hospitalização e morbimortalidade nesse grupo de pacientes (Charache et al., 1992; Platt, 2008).

A transfusão sanguínea é outra opção terapêutica nas doenças falciformes. A transfusão simples de concentrado de hemácias pode ser utilizada no caso de piora da anemia, que pode ocorrer especialmente durante o tratamento das crises álgicas por vaso-oclusão. Outras duas modalidades de transfusão feitas de forma eventual também são utilizadas: a exsanguíneotransfusão, ou troca sanguínea manual, em que o paciente é submetido a sangrias terapêuticas e transfusões sucessivas; e a eritrocitaférese, ou troca automatizada das hemácias, através de uma máquina de aférese que substitui apenas o componente eritrocitário do sangue mediante separação por centrifugação. Ambas podem ser utilizadas, principalmente quando o paciente apresenta complicações como acidente vascular cerebral e síndrome torácica aguda grave, em que há a necessidade de reduzir rapidamente os níveis de HbS. Os programas regulares de transfusão também são uma alternativa para os pacientes que não respondem a hidroxiureia, e são indicados na prevenção do acidente vascular cerebral em pacientes de alto risco, na manutenção dos pacientes após acidente vascular cerebral, na insuficiência cardíaca, entre várias indicações (Araújo, 2007). Nesses casos, os pacientes ficam mais sujeitos a sobrecarga de ferro grave em função do aporte regular desse metal pela transfusão.

Sabe-se que a deposição de ferro na anemia falciforme está associada com maior mortalidade, embora ocorra de forma mais lenta do que em pacientes com outras anemias hereditárias dependentes de transfusão, como, por exemplo, nas talassemias (Ballas, 2001; Fung et al., 2006). Atribui-se essa diferença parcialmente ao fato de a exsanguineotransfusão e a eritrocitaférese, utilizadas nas doenças falciformes e não em talassemia, pouparem certa quantidade de ferro exógeno recebido pelos pacientes (Ballas, 2001). O acúmulo de ferro nos pacientes com doença falciforme em terapia transfusional ocorre majoritariamente no fígado, o que pode acarretar insuficiência hepatocítica por fibrose hepática, de modo que tais pacientes são candidatos a terapia quelante de ferro a longo prazo.

## **1.2 Talassemias $\beta$**

A sobrecarga de ferro também é importante nas talassemias, outro tipo de hemoglobinopatia. São as doenças monogênicas mais comuns em humanos e ocorrem com maior frequência nas populações originárias dos países do Mediterrâneo, Índia e Sudeste asiático, em que a frequência gênica está em torno de 3 a 10% dependendo da mutação, podendo chegar a afetar até 30 a 40% da população. São doenças hereditárias em que diferentes mutações nos genes das globinas  $\alpha$  ou  $\beta$ , que compõem a hemoglobina A do adulto, geram diminuição ou ausência da transcrição desses genes, com consequente desequilíbrio na produção das cadeias globínicas da hemoglobina. No caso das talassemias  $\beta$ , o excesso de cadeias  $\alpha$  gera apoptose intramedular dos eritroblastos, eritropoese ineficaz e, portanto, anemia, com níveis variáveis de dependência transfusional (Olivieri, 1999).

A talassemia  $\beta$  pode se apresentar de três formas clínicas: a talassemia  $\beta$  menor, também chamada de traço talassêmico  $\beta$ , genotipicamente caracterizada pela presença de apenas um dos cromossomos com mutação do gene da globina  $\beta$  (mutação em heterozigose), em que o paciente apresenta apenas anemia leve com hemácias hipocrômicas e microcíticas, sem repercussão clínica ou qualquer necessidade de transfusão sanguínea; a talassemia  $\beta$  intermediária, em que o paciente tem anemia hemolítica crônica com níveis diminuídos de hemoglobina sérica, em torno de 7 a 10g/dL, geralmente sem dependência

transfusional, mas podendo evoluir no decorrer da vida adulta com necessidade de transfusão; e a talassemia  $\beta$  maior, com anemia grave, com níveis de hemoglobina sérica abaixo dos 7g/dL, com dependência transfusional desde o primeiro ano de vida (Olivieri & Weatherall, 2001).

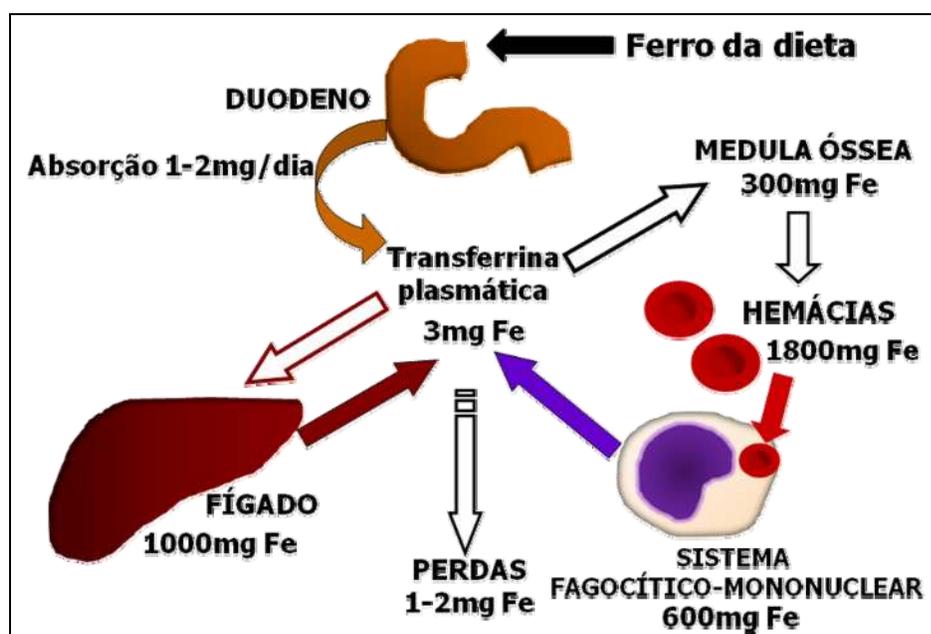
A sobrecarga de ferro é responsável pela maior parte das morbidades dos pacientes portadores de talassemia, pois o acúmulo anormal desse metal ocorre mesmo nos pacientes com forma intermediária, independentes de transfusão regular, e resulta em deposição em diversos órgãos: fígado, coração, pâncreas, tireoide, paratireoide e hipófise. Ao longo dos anos, se não forem tratados com quelantes para ferro, esses pacientes evoluem com cirrose hepática, cardiomiopatia com insuficiência cardíaca, diabetes mellitus, hipotireoidismo e hipogonadismo, entre outras complicações que levam ao óbito precoce (Zurlo et al., 1989).

Do início do século XX, quando as primeiras descrições científicas de hemoglobinopatias como a anemia falciforme foram feitas, até a atualidade, ocorreu um grande aumento na sobrevivência desses pacientes devido a avanços no diagnóstico e tratamento precoces, aliados a melhorias significativas na terapia transfusional, com qualidade superior dos componentes do sangue utilizados de forma terapêutica. Dessa forma, tornou-se progressivamente mais importante o conhecimento sobre o papel do ferro e o controle de seu metabolismo no organismo humano, uma vez que pacientes portadores de anemias hereditárias crônicas e seus médicos lidam cada vez mais com a sobrecarga de ferro como a principal complicação do tratamento dessas doenças.

### **1.3 Importância do ferro no corpo humano e seu metabolismo**

O ferro é um elemento presente na natureza essencial a muitos processos bioquímicos. Ele faz parte da estrutura de um grande número de proteínas humanas, tais como a hemoglobina, a mioglobina, algumas enzimas da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons e do sistema do citocromo P450 hepático, entre outras. (Perutz, 2001; Hentze et al., 2004)

A produção diária de mais de 200 bilhões de novas hemácias no corpo humano demanda aproximadamente 20mg de ferro para a síntese de hemoglobina, correspondendo a aproximadamente 80% da demanda diária de ferro em humanos. A quantidade absoluta de ferro no organismo é mantida praticamente em níveis constantes, ao redor de 3 a 4g. Dois terços desse *pool* endógeno está na forma de hemoglobina nas hemácias circulantes e no sistema retículo-endotelial, onde há a reciclagem da hemoglobina das hemácias senescentes pelas células fagocíticas e da linhagem monocítica, devolvendo o ferro decorrente da degradação da hemoglobina para nova síntese. O conteúdo de ferro absorvido a partir de uma dieta alimentar de padrão ocidental é de aproximadamente 1 a 2mg por dia desse nutriente, o suficiente para compensar perdas habituais por descamação celular e pequenas perdas sanguíneas (Figura 1).



**Figura 1** - Distribuição do ferro no organismo humano. As flechas cheias representam as vias que devolvem o ferro para a circulação sanguínea, e as flechas vazias representam as vias que o retiram da circulação e levam aos órgãos que o utilizam, e as perdas do ferro pelo organismo.

Sua importância nos processos biológicos se dá principalmente por suas propriedades químicas como um metal de transição. Ele participa de reações de oxirredução entre seus estados férrico ( $Fe^{3+}$ ) e ferroso ( $Fe^{2+}$ ), que ocorrem em condições fisiológicas do corpo humano (Hentze et al., 2004).

Em geral, os mamíferos carecem de mecanismos eficazes de excreção do ferro, de modo que o controle ocorre através da limitação da absorção intestinal de ferro para que ela se equipare às necessidades sistêmicas. Assim, esse metabolismo é dotado de uma regulação fina através de um sistema complexo de transportadores, proteínas e retroalimentação (“*feedback*”) de receptores que controlam a absorção do ferro, sua estocagem e liberação para os tecidos, e estabelecem a comunicação entre as células que consomem ferro (precursores eritroides da medula óssea) e células que captam e estocam ferro (enterócitos duodenais, hepatócitos e macrófagos) (Nemeth e Ganz, 2006).

O ferro obtido através da dieta pode ser classificado como ferro heme ou não-heme. O ferro não-heme é obtido a partir da ingestão de vegetais, está na forma férrica inorgânica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e é absorvido pelos enterócitos através do transportador divalente de metais 1 (DMT1) após a redução para  $\text{Fe}^{2+}$  pelo citocromo b duodenal (Trinder et al., 2002). Já o ferro heme está presente nos alimentos de origem animal, e é absorvido por uma proteína carreadora do heme, sendo depois degradado no interior do enterócito pela heme oxigenase-1 (HO-1). O ferro  $\text{Fe}^{2+}$  é então liberado na circulação sanguínea através da ferroportina, o único transportador desse metal descrito em células de mamíferos, e presente no lado vascular dos enterócitos. Ele é novamente oxidado a  $\text{Fe}^{3+}$  pela enzima hefestina. Por fim, os átomos de ferro se ligam à transferrina (Tf), forma na qual circulam no plasma, sendo que a maior parte desse ferro é utilizada na eritropoese (Andrews, 1999). O complexo Fe-Tf é captado pelos eritroblastos na medula óssea, que expressam fortemente o receptor de transferrina 1 (TfR1), e em menor quantidade pelos hepatócitos, que além do TfR1, também expressam o receptor de transferrina 2 (TfR2) e também têm um terceiro mecanismo de absorção do Fe-Tf independente de receptor. Em condições normais de absorção de ferro, a fração absorvida no fígado é estocada na forma de ferritina e hemossiderina.

A ferritina é uma proteína heterodimérica que estoca ferro na forma de hidroxifosfato férrico. Cada molécula pode agregar até 4500 átomos de  $\text{Fe}^{3+}$  e liberá-los em situações de carência desse elemento. Ela está presente no fígado, baço, medula óssea, e em quantidade muito menor no plasma como ferritina sérica. Seus valores se correlacionaram aos níveis totais de ferro corporal em estudo através de sangrias sucessivas (Jacobs et al., 1972), e, por isso, ela ainda é um dos meios mais simples de se avaliar a presença ou não de

sobrecarga de ferro, muito embora seus níveis possam se elevar na vigência de processos inflamatórios, doenças hepáticas, neoplasias, síndrome hemofagocítica etc.

Quando há excesso de ferro, a transferrina circulante não é suficiente para ligar todo o ferro livre, ocorrendo não apenas o acúmulo de ferritina (especialmente no fígado), mas também a saturação da capacidade da transferrina. Isso leva à formação de ferro não-ligado à transferrina (NTBI, do inglês *non-transferrin-bound iron*). O NTBI é captado pelos hepatócitos através do mesmo transportador DMT1 presente no intestino, e também por um receptor específico Zip14 (Liuzzi et al., 2006). Esse tipo de ferro é tóxico para o organismo porque gera espécies reativas de oxigênio (radicais hidroxila de superóxido ou de peróxido de hidrogênio), capazes de reagir com carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos, levando a morte celular, fibrose e carcinogênese nos tecidos em que ele se acumula. Dessa forma, o equilíbrio dessas reações precisa ser cuidadosamente regulado para evitar danos irreversíveis aos órgãos.

#### **1.4 Causas primárias e secundárias de sobrecarga de ferro**

Uma das primeiras descobertas sobre a codificação genética responsável pelo controle do ferro no corpo humano foi a caracterização do papel do gene *HFE* (Feder et al., 1996; Lebron et al., 1998). Esse gene codifica um membro da família de proteínas do complexo maior de histocompatibilidade tipo I que se heterodimeriza com a  $\beta_2$ -microglobulina e está envolvido no controle da absorção intestinal de ferro. A mutação mais importante, C282Y, que ocorre na região cromossômica 6p21.3, está associada com a forma clássica da hemocromatose primária (tipo 1), ou hemocromatose HFE. Outras mutações, como a H63D, S65C e Q283P, já foram descritas e podem se associar ao acúmulo de ferro no organismo quando em heterozigose com a C282Y (Andrews, 1999; Pietrangelo, 2007; Mura, 1999; Le Gac, 2003). Muitas populações brasileiras já foram estudadas, desde doadores de sangue a pacientes com hemoglobinopatias, investigando a importância dessas mutações e sua influência na sobrecarga de ferro (Agostinho et al., 1999, Bittencourt et al., 2002, Barbosa et al., 2005, Pericole et al., 2005, Cançado et al.,

2006, Oliveira et al., 2006, Torres et al., 2008, Oliveira et al., 2009, Santos et al., 2010, Santos et al., 2011).

Outras formas primárias de hemocromatose são denominadas “não-HFE”, e se devem a mutações raras e geneticamente heterogêneas. A hemocromatose tipo 3 é causada por alteração no gene *TFR2*, e clinicamente é semelhante à tipo 1. A alteração do gene da hemojuvelina, *HJV*, causa o tipo 2a de hemocromatose juvenil, com sobrecarga precoce de ferro hepático, com hipogonadismo e complicações cardíacas frequentes, enquanto o tipo 2b se deve à perda da função do gene que codifica a hepcidina. Tais mutações, apesar de raras, também já foram descritas no Brasil (Santos et al., 2011). Os vários tipos de hemocromatose primária estão comparados na Tabela I.

**Tabela 1** - Classificação das formas genéticas de hemocromatose

<b>Doença</b>	<b>Tipo</b>	<b>Gene</b>	<b>Proteína</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Herança</b>
<b>Hemocromatose clássica</b>	1	<i>HFE</i>	HFE	6p	AR
<b>Hemocromatose juvenil</b>	2a	<i>HJV</i>	hemojuvelina	1q	AR
<b>Hemocromatose juvenil</b>	2b	<i>HAMP</i>	hepcidina	19q	AR
<b>Hemocromatose clássica</b>	3	<i>TFR2</i>	receptor de transferrina 2	7q	AR
<b>Doença da ferroportina</b>	4	<i>SLC40A1</i>	ferroportina	2q	AD

Adaptado de Camaschella, 2009.

AR, autossômica recessiva; AD, autossômica dominante.

Diferentemente do que ocorre nas hemocromatoses primárias, em que geralmente há envolvimento de mutações genéticas nas regiões codificadoras das proteínas que participam da regulação do metabolismo do ferro, nas hemoglobinopatias e outras anemias hereditárias, a sobrecarga de ferro geralmente é secundária. O acúmulo desse metal se deve, na maioria dos casos, ao aumento iatrogênico do aporte, através de transfusões sanguíneas repetidas, que superam a capacidade do organismo humano de excretar o ferro em excesso. As hemácias transfundidas são captadas e degradadas pelo sistema retículo-

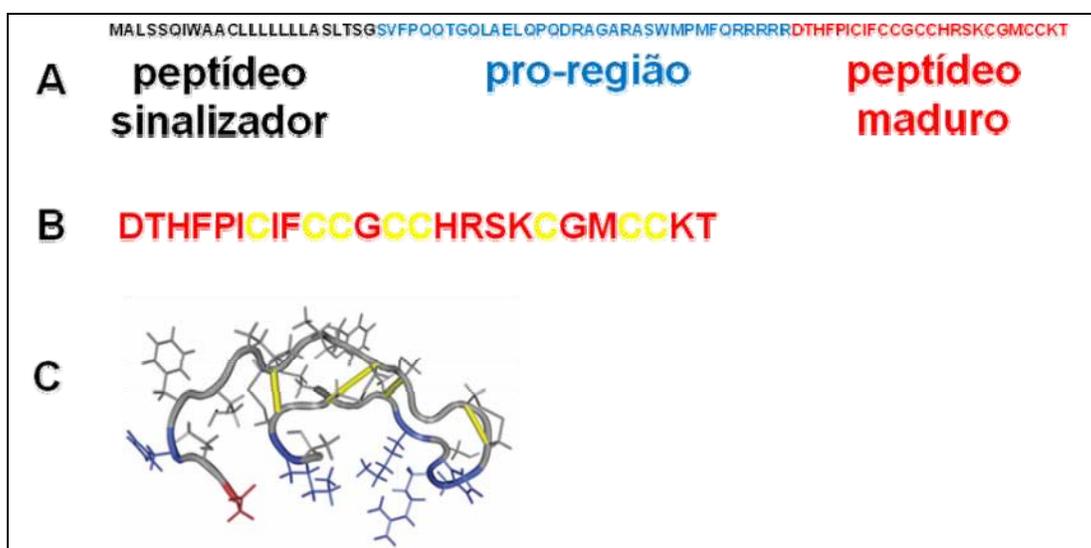
endotelial, que fica sobrecarregado de ferro e acaba saturando a capacidade da transferrina, gerando a produção do NTBI. Cada mililitro de concentrado de hemácias com hematócrito em torno de 65% contém de 1 a 2mg de ferro elementar, o que equivale a todo o aporte enteral diário. Assim, o paciente que necessita de transfusão regular para o tratamento de anemia de causa genética sofre rapidamente de sobrecarga de ferro, como ocorre, por exemplo, nas talassemias.

Outras causas secundárias de sobrecarga de ferro são os estados inflamatórios. Estudos já descreveram a capacidade da IL-6, produzida quando há inflamação crônica, de elevar os níveis de ferritina (Nemeth, 2004; Lee, 2005). Pacientes com hepatite C frequentemente apresentam níveis elevados de ferritina sérica e de saturação de transferrina, assim como acúmulo de ferro visualizado em material obtido de biópsia hepática. Níveis elevados de espécies reativas de oxigênio geradas pelo HCV parecem contribuir como um dos mecanismos que favorecem o aumento de ferro hepático através de alterações na regulação da absorção de ferro. O uso de sangria terapêutica demonstrou melhora dos níveis de transaminases nesses pacientes, e há maior risco de hepatocarcinoma quanto maior o conteúdo de ferro no fígado (Furutani, 2006; Miura, 2008).

### **1.5 Hepsidina e a regulação da absorção do ferro**

A hepcidina é o principal regulador do metabolismo do ferro em humanos. Trata-se de um polipeptídeo composto por uma sequência de 25 aminoácidos, excretado por via urinária e inicialmente reconhecida apenas por suas propriedades antimicrobianas (Krause et al., 2000). No entanto, estudos posteriores demonstraram seu papel fundamental na regulação do ferro e a modulação dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) do gene que a codifica pelos estoques de ferro, níveis de anemia, hipóxia e inflamação em estudos realizados em culturas celulares, camundongos e humanos (Pigeon et al., 2001; Nicolas et al., 2001). A hepcidina é produzida e liberada na corrente sanguínea predominantemente pelos hepatócitos, e em menor quantidade pelos monócitos e macrófagos, a partir da transcrição do gene *HAMP* (Park et al., 2001).

A tradução do gene *HAMP* resulta na síntese da pré-pro-hepcidina, uma cadeia polipeptídica de 84 aminoácidos contendo um peptídeo sinalizador de 24 aminoácidos e um segmento que, por conta de um sítio reconhecido por furina na porção N-terminal, resulta na liberação da hepcidina a partir da clivagem da pro-hepcidina. Análises por espectrometria de massa e espectroscopia por ressonância nuclear magnética demonstraram que a forma da hepcidina-25, como é chamada a forma biologicamente ativa, contém 4 pontes dissulfeto em sua estrutura terciária, tornando-a mais estável na circulação (Park et al., 2001) (Figura 2). Por outro lado, isso contribuiu significativamente para as dificuldades técnicas de se padronizar ensaios que quantificassem fidedignamente seus níveis.



**Figura 2** - Estrutura da hepcidina. Em (A), a sequência de aminoácidos da pré-pro-hepcidina, destacando as três regiões (peptídeo sinalizador, pro-hepcidina e hepcidina madura ou hepcidina-25). Em (B), a sequência de aminoácidos da hepcidina-25, destacando em amarelo os resíduos de cisteína que formam pontes dissulfeto na estrutura terciária (C).

Técnicas de quantificação por imunoenensaio foram desenvolvidas para a pro-hepcidina, porém os valores obtidos não se correlacionaram com a regulação dos níveis de ferro como observado nos estudos da hepcidina em sua forma madura. Os métodos para dosagem de hepcidina-25 foram inicialmente baseados em cromatografia de troca catiônica com quimioluminescência em amostras de urina normalizadas para a diluição em função dos níveis de creatinina, ou baseados em espectrometria de massa, com uso de plataformas tipo MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation - time of flight*) ou SELDI-TOF (*Surface enhanced laser desorption/ionization - time of flight*), com resultados em sua

maioria semiquantitativos, de execução complexa ou dependentes de equipamentos relativamente caros e pouco disponíveis. Em 2008, foi descrito o primeiro imunoenensaio tipo “ELISA” (Ganz et al., 2008), que ainda é atualmente o único validado com métodos espectrométricos e disponível somente em caráter experimental para pesquisa científica, mas que permite uma medida acurada dos níveis em amostras de soro, plasma ou urina humanos.

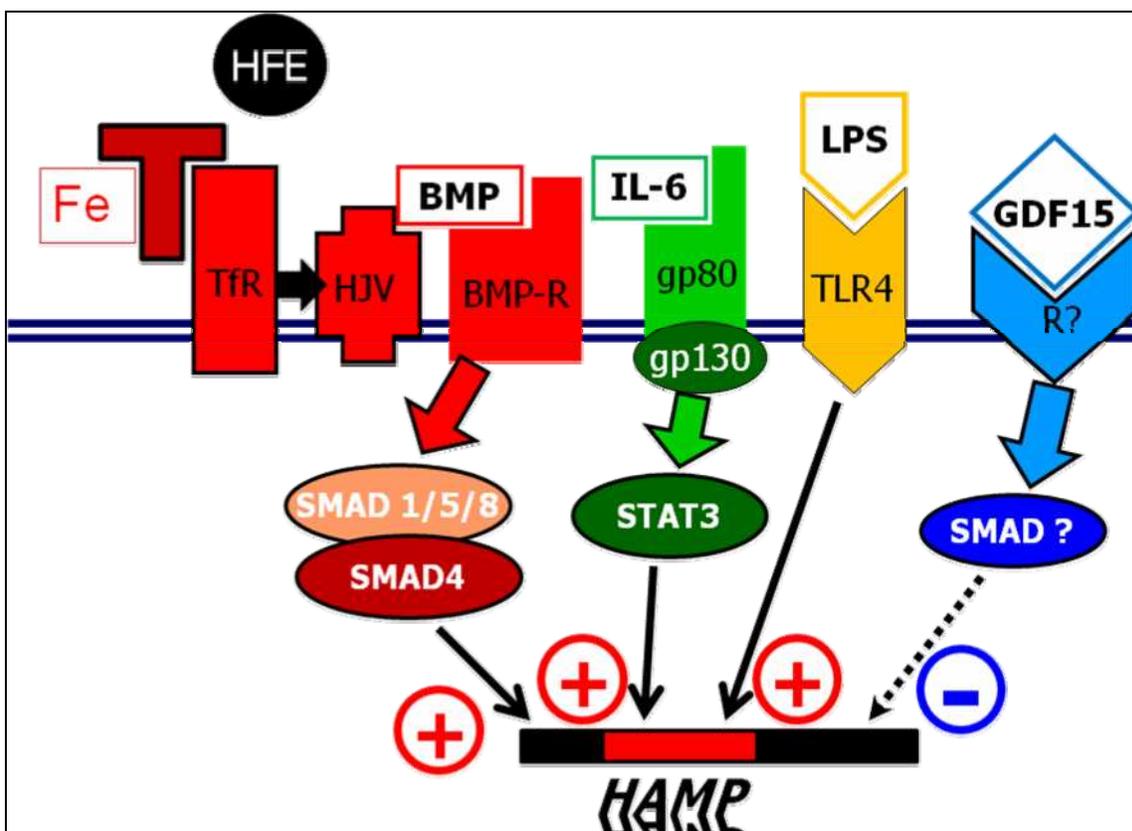
A produção excessiva de hepcidina está ligada ao aparecimento de anemia (Weinstein et al., 2002), e a diminuição de sua expressão se correlaciona com sobrecarga de ferro em várias formas de hemocromatose (Roetto et al., 2003; Pietrangelo, 2007).

As evidências da influência da hepcidina nos níveis de ferro foram demonstradas por estudos em camundongos, em que a deleção do gene *HAMP* resultou em alta deposição de ferro no fígado e pâncreas desse animais, e a superexpressão do mesmo gene em outro modelo murino gerou anemia grave não passível de correção com suplementação de ferro, destacando o papel desse peptídeo na absorção intestinal desse metal (Pigeon et al., 2001).

A regulação da homeostase do ferro pela hepcidina ocorre através de sua interação com a ferroportina, molécula exportadora de ferro expressa em todos os tecidos que lidam com grandes fluxos desse metal (enterócitos duodenais, hepatócitos, eritroblastos e células do sistema retículo-endotelial) (Nemeth et al., 2004a; Donovan et al., 2005; Zhang et al., 2011). Ela é codificada pelo gene *SLC40A1*, em que mutações se associam à segunda forma mais comum de hemocromatose primária, a tipo 4, ou doença da ferroportina, que possui um fenótipo atípico, pois os níveis de saturação de transferrina são geralmente normais, e ocorre sobrecarga principalmente nos macrófagos, com altos níveis de ferritinemia. Ocorre modulação da função da ferroportina quando, na presença de aumento dos níveis da hepcidina, a ligação entre essas proteínas causa a internalização e subsequente degradação da ferroportina, com conseqüente queda do efluxo de ferro para o plasma, e diminuição da biodisponibilidade desse elemento.

## 1.6 Mecanismos reguladores da produção de hepcidina

Atualmente, reconhecem-se vários mecanismos de regulação da produção de hepcidina (Figura 3). O primeiro deles envolve a chamada via “ferro-sensória”, e depende da quantidade de ferro disponível no organismo. Participam dessa regulação a hemojuvelina e a mais recentemente descrita matriptase-2. O ferro ligado a transferrina só é capaz de se ligar ao receptor de transferrina quando esse se desliga da molécula HFE, gerando uma ativação da hemojuvelina com mudança conformacional. Nessa forma, a hemojuvelina pode atuar como co-receptor de proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs, do inglês *bone morphogenetic proteins*) na superfície do hepatócito, ativando o complexo SMAD1/5/8-SMAD4, gerando aumento da transcrição do gene da hepcidina (Babitt et al., 2006). Destaca-se no grupo das BMPs a BMP6, cujo modelo murino *knock-out* apresenta sobrecarga de ferro pela incapacidade de produzir níveis adequados de hepcidina. No outro extremo dessa regulação, camundongos com *knock-out* do gene *TMPRSS6*, que codifica a matriptase-2, desenvolvem anemia ferropriva grave pelo aumento (*upregulation*) da hepcidina, que impede o efluxo de ferro do enterócito para o plasma (Du et al., 2008; Finberg et al., 2008; Folgueras et al., 2008). O papel da matriptase-2 na absorção de ferro foi confirmado na investigação de uma família portadora de anemia ferropriva resistente a ferro oral, que possuía uma mutação no gene *TMPRSS6* (Melis et al., 2008). Há evidências de que a matriptase-2 reduz a expressão de hepcidina através de sua ação proteolítica na superfície do hepatócito que impediria a ativação da hemojuvelina e, portanto, o estímulo à expressão de hepcidina por BMPs (Camaschella e Silvestri, 2008).



**Figura 3** - Representação esquemática simplificada dos ligantes BMP, IL-6, LPS e GDF-15, seus receptores e vias de sinalização que regulam a transcrição do gene *HAMP*, que codifica a hepcidina.

Além da via ferro-sensória, também há regulação da produção de hepcidina pelas vias chamadas “inflamatórias”, envolvendo citocinas como a interleucina-6. A IL-6 também é um potente estimulador da produção de hepcidina tanto em hepatócitos quanto em monócitos (Theurl I et al., 2008). Acredita-se que os altos níveis de IL-6 produzidos na presença de processo inflamatório crônico sejam responsáveis pela retenção de ferro nos tecidos e fisiopatologicamente responsáveis pela anemia de doença crônica ou “anemia da inflamação”, uma síndrome comum na prática clínica e já descrita em entidades nosológicas variadas como artrite reumatóide, mieloma múltiplo e doença de Castleman (Ganz, 2005, Nemeth et al., 2004, Cançado e Chiattonne, 2002). A IL-6 se liga ao seu receptor e ativa a glicoproteína gp130, estimula STAT3, que também aumenta a transcrição do gene *HAMP*.

Outra contribuição à produção de hepcidina por estímulo inflamatório é mediada pela proteína TLR4, um receptor de lipopolissacarídeos (LPS). Estudos *in vitro* demonstraram que células submetidas a tratamento com purificados de parede celular de bactérias contendo LPS produzem altos níveis de hepcidina por meio da ativação desse receptor.

Classicamente, os estímulos inibitórios da produção de hepcidina são a anemia e hipóxia. Quando ocorre déficit de oxigenação tecidual, há a produção de eritropoetina, capaz de reprimir a produção da hepcidina em hepatócitos através de sinalização pelo receptor de eritropoetina EPO-R e regulação do fator de transcrição C/EBP $\alpha$  (Pinto et al., 2008). Outra via de sinalização influenciada por hipóxia envolve o HIF-1 (fator induzível por hipóxia 1). Na presença de oxigênio, o monômero HIF-1 $\alpha$  é modificado por proil hidroxilases dependentes de ferro e degradado pela via ubiquitina-proteasoma. Em condições de hipóxia ou quelação de ferro, a ação das proil hidroxilases é inibida, e o HIF-1  $\alpha$  acumulado se dimeriza com HIF-1 $\beta$  expresso constitutivamente no interior das células. O heterodímero HIF-1 é capaz de se ligar a sequências regulatórias (HREs – elementos de resposta a hipóxia) de diversos genes-alvo, entre eles o gene codificante da eritropoetina, que é hiperexpressa e tem efeito inibitório sobre a produção de hepcidina. Recentemente, demonstrou-se que o HIF-1 também reduz a expressão do gene *HAMP* em células hepáticas diretamente, ligando-se à região promotora desse gene (Peyssonaux et al., 2007). Nas anemias por carência de ferro e em modelos animais de sangramento, a hepcidina urinária está diminuída. Entretanto, isso também ocorre sem que falte ferro, como nas anemias hereditárias com eritropoese ineficaz e em modelos animais de hemólise (Kearney et al., 2007; Origa et al., 2007; Bondi et al., 2005; Pak et al., 2006).

O exato mecanismo regulador da eritropoese sobre a hepcidina ainda não está totalmente esclarecido, porém hipotetizou-se que haveria um mecanismo repressor da produção da hepcidina através do fator de crescimento e diferenciação 15, ou GDF-15 (do inglês *growth and differentiation factor 15*) (Tanno et al., 2007).

## 1.7 GDF-15 e hepcidina

O GDF-15 é uma citocina da superfamília do fator de crescimento tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Em uma análise transcriptômica de eritroblastos de pacientes portadores de talassemia raras em nosso meio, como E- $\beta$  talassemia, HbLepore/ $\beta$ -talassemia e doença da HbH, mostrou que o gene *GDF15* estava superexpresso. Análises subsequentes detectaram grandes quantidades dessa citocina no soro desses pacientes, corroborando a hipótese de que a eritropoese ineficaz presente na medula óssea levaria à produção de altos níveis de GDF-15, inibindo a produção sistêmica de hepcidina, permitindo absorção excessiva de ferro, uma explicação fisiopatológica que justificaria a ocorrência de sobrecarga de ferro espontânea nessas doenças. Estudos com outras doenças em que a eritropoese ineficaz é um processo patológico importante, tais como anemia diseritropoiética congênita tipos I e II e deficiência de piruvato quinase também encontraram alta produção de GDF-15 (Tamary et al., 2008, Finkenstedt et al., 2009, Casanovas et al., 2011). Entretanto, todos os estudos envolvendo a relação entre eritropoese e ferro até o momento têm se baseado na observação de doenças raras, de apresentação clínica heterogênea e *sui generis*, sendo necessárias mais evidências para melhor caracterizar o papel desempenhado pelo GDF-15 no complexo uso do ferro corporal regulado pela hepcidina.

A compreensão dos mecanismos reguladores do ferro é de particular importância nas hemoglobinopatias, pois são quadros anêmicos que podem cursar com tendência espontânea a sobrecarga de ferro, como nas talassemias  $\beta$ , ou mesmo com indicação de transfusões sanguíneas repetidas ou de forma crônica, levando a sobrecarga exógena de ferro, como nas doenças falciformes.

## 1.8 Hpcidina em monócitos e macrófagos

Embora a hepcidina tenha sua maior produção no fígado, alguns estudos demonstraram sua produção extra-hepática. Liu et al. demonstraram que macrófagos retirados do baço de camundongos produziam hepcidina quando tratados *in vitro* com LPS (Liu et al., 2005). Em outro estudo, o papel antimicrobiano da hepcidina foi explorado em

macrófagos alveolares (Nguyen et al., 2006). Já no caso de doenças inflamatórias crônicas, caracterizou-se a produção de hepcidina por monócitos de pacientes portadores de artrite reumatoide e tuberculose em resposta a tratamento com IL-6, contribuindo para o entendimento da retenção do ferro no sistema retículo-endotelial como parte da fisiopatologia da anemia da inflamação (Theurl et al., 2008). Mais recentemente, nosso grupo demonstrou que células mononucleares circulantes de pacientes portadores de anemia falciforme apresentam expressão de hepcidina (Gambero et al., 2009), sugerindo contribuição nessa produção por parte dos monócitos.

### **1.9 Hemoglobinopatias e hepcidina**

Um estudo sobre a hepcidina nos pacientes com hemoglobinopatias constatou que, em pacientes portadores de talassemia  $\beta$  intermediária não submetidos a transfusão, os níveis de hepcidina urinária estão muito diminuídos, apesar de altos níveis de ferro sérico e tecidual (Origa et al., 2007). Um modelo murino de talassemia  $\beta$  demonstrou que há redução da expressão da hepcidina associada ao aumento da ferroportina, ressaltando como a hepcidina pode contribuir para a hemocromatose secundária nas anemias com eritropoese ineficaz (Gardenghi et al., 2007). Em outro modelo experimental, foram estudados camundongos transgênicos portadores de deleção do gene *HFE* e, portanto, geneticamente predispostos a hemocromatose, e também portadores de um gene da hepcidina cuja expressão era induzível por tetraciclina (Viatte et al., 2006). A hepcidina só foi induzida na fase adulta, quando os animais já apresentavam sobrecarga de ferro, e os altos níveis de ferro hepático foram reduzidos às custas do deslocamento desse excesso para o sistema retículo-endotelial. Isso torna a indução da hepcidina uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento das enfermidades que cursam com sobrecarga de ferro.

Embora os macrófagos, monócitos e células de Kupffer hepáticas, entre outros membros do sistema retículo-endotelial, sejam responsáveis pela maior parte da reciclagem do ferro no organismo humano, pouco se sabe sobre a regulação desse metabolismo por essas células. Um estudo em camundongos deficientes na expressão do gene *HFE* demonstrou que, nesses animais, a regulação do ferro hepático e esplênico e a expressão de

hepcidina hepática seriam dependentes desse gene (Makui et al., 2008). Entretanto, ainda não é claro se a alteração dos níveis de hepcidina monocítica pode influenciar a relação entre os vários tipos celulares envolvidos, nem se há relação com a sobrecarga de ferro que observamos em algumas formas de hemoglobinopatia.



## *Objetivos*

---



## 2 Objetivos Gerais

---

1 Avaliar aspectos da relação entre regulação do metabolismo do ferro e eritropoese, comparando hemoglobinopatias frequentes na população brasileira com presença e ausência de eritropoese ineficaz e outras formas de anemia;

2. Caracterizar a produção de hepcidina em monócitos humanos nas hemoglobinopatias e avaliar fatores moduladores da expressão da hepcidina monocítica.

### 2.1 Objetivos Específicos

Em relação ao estudo da relação entre regulação do metabolismo do ferro e eritropoese:

1 – Determinar os níveis de GDF-15 em diferentes populações, comparando indivíduos controle e pacientes com anemia falciforme, talassemia  $\beta$  intermediária, anemia por deficiência de cobalamina e hemólise crônica de outras causas;

2 – Correlacionar os dados obtidos com aspectos clínicos, parâmetros hematimétricos e medidas de estoque corporal de ferro e de citocinas envolvidas na regulação do metabolismo do ferro;

3 – Determinar os níveis de pro-hepcidina e hepcidina plasmáticos e correlacionar com os demais dados.

Em relação ao estudo da hepcidina em monócitos humanos:

1- Determinar e comparar a expressão gênica de hepcidina, ferroportina, cadeia leve e pesada da ferritina, receptor TLR4 e proteínas de sinalização intracelular STAT3 e SMAD4 em monócitos circulantes de pacientes com anemia falciforme, talassemia  $\beta$  intermediária e indivíduos normais;

2 – Correlacionar os dados obtidos com aspectos clínicos, parâmetros hematimétricos, medidas de estoque corporal de ferro, níveis de pro-hepcidina, hepcidina e de citocinas que influenciam a produção de hepcidina (IL-6 e GDF-15);

3 – Comparar com a expressão gênica de hepcidina em um modelo *in vitro* de cultura celular de linhagem monocítica.



# *Casuística e Métodos*

---



### 3 Casuística e Métodos

#### 3.1 Casuística

No período de julho de 2009 a março de 2011, foram selecionados 103 pacientes, sendo 53 pacientes portadores de anemia falciforme, 20 de talassemia  $\beta$  intermediária, 15 de anemia por deficiência de cobalamina e 13 de hemólise crônica de outras causas, em seguimento regular ambulatorial, no Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP ou no Hemocentro de Pernambuco – HEMOPE.

No caso das hemoglobinopatias, todos os pacientes apresentavam diagnóstico confirmado por eletroforese de hemoglobina, cromatografia líquida de alta performance (HPLC) (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA), com sequenciamento automático para confirmação da mutação quando necessário. Os pacientes com anemia falciforme apresentaram idade mínima de 18 anos de idade, encontrando-se em fase estável, na ausência de infecção ou processos inflamatórios agudos, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses e sem crises de dor por este mesmo período. Os pacientes com talassemia apresentaram idade mínima de 18 anos de idade, sem transfusão sanguínea por pelo menos três meses, sem uso prévio de quelantes de ferro.

No caso da anemia por deficiência de cobalamina, o diagnóstico foi confirmado através de história clínica de anemia, com achados de exame físico compatíveis (como, por exemplo, língua despapilada e/ou neuropatia periférica) e análise do hemograma com esfregaço de sangue periférico com achados típicos (anemia macrocítica, com presença de macro-ovalócitos e neutrófilos hipersegmentados, com ou sem outras citopenias), associados com a dosagem de cobalamina sérica abaixo de 200pg/ml. Todos os pacientes receberam tratamento com uma semana de doses diárias de cianocobalamina 5000UI por via intramuscular, seguida de doses de manutenção semanais até completa normalização do hemograma.

Os pacientes com anemias hemolíticas de outras causas se dividiram em: 7 portadores de esferocitose hereditária, 3 de anemia hemolítica autoimune em atividade, 1 de

deficiência de pirimidina-5'-nucleotidase, 1 de anemia hemolítica pós-infecção viral e 1 de anemia hemolítica crônica não-esferocítica.

Foram coletadas 17 amostras de indivíduos controle, doadas espontaneamente por voluntários sadios, alunos ou funcionários do Centro de Hematologia e Hemoterapia, com idade mínima de 18 anos de idade. As amostras foram submetidas a HPLC para confirmação da normalidade do padrão eletroforético, do hemograma completo e dos marcadores de biodisponibilidade de ferro (ferritina sérica, ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro e saturação de transferrina). Dados epidemiológicos e clínicos foram coletados em entrevista na ocasião da coleta das amostras, e também a partir dos prontuários médicos, no caso dos pacientes.

### **3.2 Aspectos éticos da pesquisa**

Este estudo foi aprovado em 17/02/2009 pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, Parecer n°. 057/2009, conforme previsto na resolução n°. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo CEP.

### **3.3 Métodos**

#### ***3.3.1 Dados hematológicos e bioquímicos***

Hemogramas completos foram realizados em aparelho Cell Dyn<sup>®</sup> (Abbott, Illinois, EUA) com diferencial de leucócitos e contagem de reticulócitos realizados automaticamente e confirmados manualmente em lâminas coradas por Leishman e azul de cresil brilhante, respectivamente.

Kits comerciais de rotina foram utilizados para medição dos níveis de ferro sérico e capacidade total de ligação ao ferro (TIBC), ferritina sérica (Ferritin-Elecsys, Fe-Roche/Hitachi, UIBC-Roche/Hitachi, Roche Diagnostics, EUA), desidrogenase láctica

(LDH-Roche, EUA), e níveis de proteína C reativa ultrasensível (CardioPhase hsCRP, Siemens, EUA), como um marcador plasmático inespecífico de inflamação.

### ***3.3.2 Determinação sérica e plasmática de GDF-15, IL-6 e pro-hepcidina***

Amostras de soro foram obtidas de sangue periférico coletado em tubo seco, deixado em repouso por, no mínimo, 2 horas e centrifugado a 2000g por 5 minutos. Amostras de plasma foram obtidas de sangue periférico coletado em tubo com anticoagulante EDTA, centrifugado a 1000g por 15 minutos. Todas as amostras foram avaliadas em duplicata com kits de ELISA comerciais específicos para GDF-15 e IL-6 de alta sensibilidade (R&D Systems, EUA), e pro-hepcidina (DRG International, EUA), utilizados conforme instruções do fabricante.

### ***3.3.3 Determinação sérica e plasmática de hepcidina***

Alíquotas das amostras de soro e plasma obtidas de sangue periférico foram submetidas a dosagem de hepcidina por método de ELISA em colaboração com Dr. Mark Westerman e Dra. Gordana Olbina, da Intrinsic Life Sciences, La Jolla, California, EUA, conforme protocolo publicado por Ganz et al. em 2008.

### ***3.3.4 Separação de monócitos de sangue periférico***

O sangue periférico foi coletado em heparina e submetido a um sistema de gradiente Ficoll-Hypaque de densidades 1.0771g/ml e 1.1191g/ml, centrifugado a 700g por 30 minutos. Após a separação, as células mononucleares foram ressuspensas em PBS (pH 7.4). Foi realizada a lise hipotônica das células vermelhas e, em seguida, as células foram lavadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI, sendo submetidas a um novo sistema de gradiente, de Percoll a 45%, centrifugado a 500g por 20 minutos para separação dos monócitos das amostras. A contagem total das células foi feita em câmara de Neubauer e a contagem diferencial em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas por Leishman.

### ***3.3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA para PCR em tempo real***

O RNA total foi extraído através dos kits de extração RNEasy (Qiagen, EUA) de acordo com as instruções do fabricante, utilizando-se os kits Mini ou Micro ajustando-se em função da quantidade de células ao final da separação. As amostras de RNA obtidas foram quantificadas por espectrofotometria (NanoDrop Technologies, Inc., EUA) e submetidas a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando-se o kit RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, EUA).

Na transcrição, utilizou-se 1.5µg de RNA tratado com a enzima DNase I (Invitrogen, Life Technologies, EUA) para remoção de DNA contaminante. O tratamento com DNase consistiu na adição de 1µl de DNase I a 1U/µl, 1µl de tampão DNase I *Reaction Buffer* 10X (200mM Tris-HCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl<sub>2</sub>) e água destilada suficiente para um volume final de 10µl de reação. As amostras foram incubadas por 15 minutos a temperatura ambiente, e a reação foi bloqueada com a adição de 1µl de EDTA a 25mM com posterior incubação por 10 minutos a 65°C. Após essa etapa, adicionou-se 1µl de *primer* oligo(dT)<sub>18</sub> a 50 µM para transcrição apenas dos fragmentos contendo cauda poli(A) característica do RNA mensageiro (RNAm), incubando-se por 5 minutos a 65°C. Em seguida, mantendo-se as amostras em gelo, foram adicionados 4µl de tampão RT *buffer* 5X, 1µl de inibidor RiboLock RNase Inhibitor 20U/µl, 2µl de solução de dNTP's a 10mM, e 1µl de enzima Revert Aid Minus M-MuLV Reverse Transcriptase 200U/µl. A reação ocorreu por 60 minutos a 42°C, seguida de 10 minutos a 70°C.

### ***3.3.6 Determinação da Expressão Gênica através da Técnica de PCR em Tempo Real***

Foram escolhidos os genes de interesse (*HAMP*, *SLC40A1*, *STAT3*, *SMAD4*, *TLR4*, *FTL*, *FTH*). Utilizaram-se os *primers* descritos por Wang et al., 2005, Nemeth et al., 2004a e Theurl I et al., 2008. Para os genes não previamente estudados, foram desenhados *primers* para amplificação de cada gene com uso de software PrimerExpress (Applied Biosystems, EUA) e a homologia com os genes escolhidos foi confirmada através do site [www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). A formação de estruturas que poderiam interferir com a eficiência dos *primers*, tais como *hairpins* e dímeros, foi verificada e corrigida através do uso do software Gene Runner (Hastings Software, Inc., EUA). Os *primers* utilizados neste estudo estão descritos na Tabela II.

**Tabela 2** - Sequências dos *primers* utilizados neste estudo

<b>Gene</b>	<b>Sequências dos <i>primers</i></b>
<i>BAC</i>	F = 5'-AGGCCAACCGCGAGAAG-3' R = 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'
<i>GAPDH</i>	F = 5'-GCACCTCAAGGCTGAGAAC-3' R = 5'-CCACTTGATTTTGGAGGGATCT-3'
<i>HAMP</i>	F = 5'-CCTGACCAGTGGCTCTGTTT-3' R = 5'-CACATCCCACACTTTGATCG-3'
<i>STAT3</i>	F = 5'-AACGAGGTCATGGTTCATGTTG-3' R = 5'-GCTACAATTGGAATGATGTCTGG-3'
<i>SMAD4</i>	F = 5'-CACCTGGAGATGCTGTTTCATAAG-3' R = 5'-GCATGACACTGACGCAAATCA-3'
<i>TLR4</i>	F = 5'-TTTCCCAGAACTGCAGGTGC-3' R = GATGGGGTTT CCTGCAATATTAA-3'
<i>FTH</i>	F = 5'-ATGAAGCTGCAGAACCAACGA-3' R = 5'-CACACTCCATTGCATTCAGCC-3'
<i>FTL</i>	F = 5'-GGCCTCCTACACCTACCTCTCTC-3' R = 5'-AGAGCCACATCATCGCGGT-3'
<i>SLC40A1</i>	F = 5'-CACACTAACATTGGGAGCCATACT-3' R = 5'-CTGAAACGTGCATGGTGGAGA-3'

F, *primer "forward"*, R, *primer "reverse"*

A determinação das expressões gênicas foi realizada em um equipamento Step One Plus (Applied Biosystems, EUA). As reações foram feitas em duplicata, utilizando como sistema de detecção o reagente SYBR<sup>TM</sup> Green PCR Master Mix<sup>®</sup> (Applied Biosystems, EUA). Os dados obtidos foram normalizados através do programa GeNorm (Vandesompele et al., 2002), utilizando-se como controles endógenos a expressão de  $\beta$ -actina e GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).

### ***3.3.7 Cultura de linhagem celular THP-1***

Alíquotas de linhagem celular monocítica THP-1 obtidas através do Banco de Células do Rio de Janeiro (Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ) foram cultivadas em meio líquido RPMI enriquecido com soro fetal bovino a 10%. Para cada um mL de RPMI foram cultivadas  $5 \times 10^6$  células em estufa de CO<sub>2</sub> a 5%, a 37°C. Para os experimentos, foram adicionadas concentrações crescentes de hidroxíureia (Sigma-Aldrich, EUA) (400µM, 800µM e 1600µM) diluída em água destilada, incubando-se as células por período de 6 horas.

### ***3.3.8 Análise estatística***

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) ou desvio-padrão como indicado, e os dados de cada grupo (controle, pacientes ou cada linhagem celular em tratamento) foram comparados com uma significância estabelecida de  $p < 0.05$ , utilizando-se análise de variância (ANOVA) para três ou mais grupos, testes não paramétricos de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis, bem como teste t pareado e correções de Bonferroni, pós-teste de Dunn ou Dunnett, e pós-teste de tendência linear, além de correlação de Spearman, conforme apropriado. Todos os cálculos e gráficos foram realizados utilizando-se o programa GraphPad Prism 5.0 for Windows (GraphPad Software, Inc., EUA).

# *Resultados*

---



## 4 RESULTADOS

---

### 4.1 Dados clínicos, bioquímicos e dosagens de GDF-15, pro-hepcidina, hepcidina e IL-6 de pacientes e controles.

No estudo da relação entre eritropoese e regulação do metabolismo do ferro, foram estudados 73 pacientes com hemoglobinopatias, sendo 20 portadores de talassemia  $\beta$  intermediária homozigótica para a mutação IVS-I-6 T $\rightarrow$ C (idades 18-72 anos), e 53 pacientes portadores de anemia falciforme (idades 18-48 anos), além de 17 controles afrobrasileiros sem hemoglobinopatia ou distúrbio do metabolismo do ferro (idades 21-53 anos). Em relação ao histórico pessoal de transfusões sanguíneas, os pacientes com anemia falciforme sem uso de hidroxiureia foram questionados quanto ao número de transfusões que já haviam recebido durante toda a vida, sendo então divididos em dois grupos:

- pacientes que haviam recebido até 20 unidades de concentrados de hemácias (CH), denominado grupo SS-N, “anemia falciforme não politransfundido”
- pacientes que haviam recebido mais de 20 CH, denominado grupo SS-T, “anemia falciforme politransfundido”.

Foram classificados no grupo SSHU (anemia falciforme em uso crônico de hidroxiureia) os pacientes em tratamento regular com esse quimioterápico, sendo que todos os indivíduos deste grupo estavam em uso do fármaco há mais de seis meses.

Os dados hematológicos, bioquímicos e demais dosagens laboratoriais estão resumidos na Tabela III.

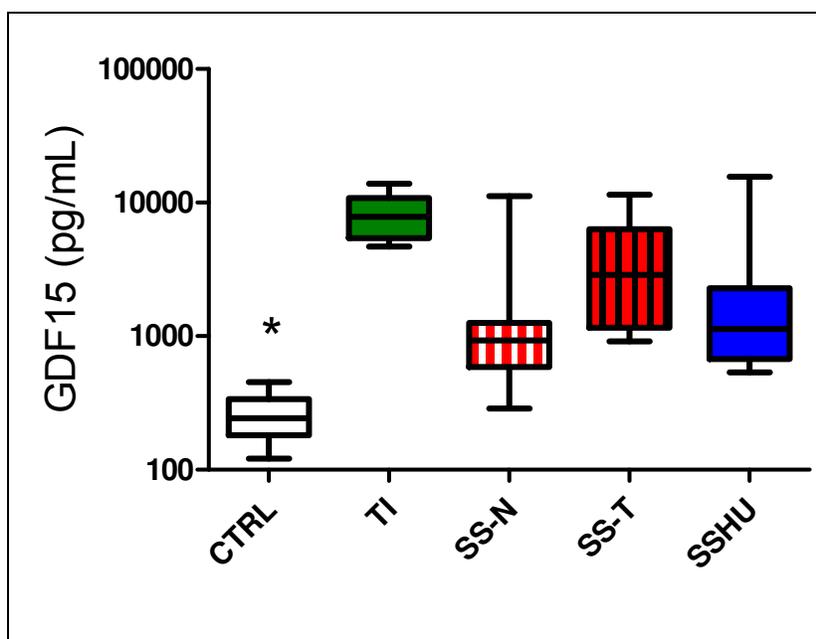
Como esperado, houve diferença significativa entre os pacientes em comparação com o grupo controle em relação a Hb, Ht, reticulócitos e LDH, assim como o VCM e HCM dos pacientes com talassemia e dos pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia ( $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis e Dunn) em comparação com os demais. Os níveis de proteína C reativa não diferiram significativamente entre os grupos ( $p > 0.05$ , ANOVA), porém os níveis de ferritina, ferro sérico e saturação de transferrina foram significativamente maiores nos pacientes talassêmicos do que nos outros grupos ( $p < 0.0001$ , ANOVA e Dunnett).

**Tabela 3** - Dados laboratoriais dos controles, pacientes com talassemia, anemia falciforme sem e com uso de hidroxiureia e estratificados em função do histórico transfusional.

<b>Parâmetros, unidade</b>	<b>CTRL (n=17)</b>	<b>TI (n=20)</b>	<b>SS-N (n=22)</b>	<b>SS-T (n=14)</b>	<b>SSHU (n=17)</b>
<b>Hemoglobina, g/dl</b>	13.2 (12.0-15.7)	6.9 (5.6-8.5)	8.9 (7.2-11.3)	8.1 (5.7-11.0)	8.1 (6.5-11.6)
<b>Hematócrito, %</b>	40.0 (29.9-46.8)	23.8 (18.4-30.6)	27.1 (22.2-36.8)	24.0 (17.5-33.4)	24.4 (20.1-34.0)
<b>VCM, fl</b>	87.3 (82.3-93.2)	69.0 (53.3-87.5)	94.1 (74.5-104.9)	99.0 (86.8-115.1)	109.8 (90.0-121)
<b>HCM, pg</b>	28.9 (26.4-31.0)	20.3 (15.9-26.4)	31.3 (22.9-34.6)	32.7 (27.3-38.8)	36.1 (29.3-41.0)
<b>Reticulócitos, céls por mm<sup>3</sup></b>	32,610 (25,860-41,400)	147,235 (51,480-497,800)	216,000 (84,350-374,400)	202,155 (52,670-425,000)	184,240 (48,420-275,310)
<b>LDH, U/l</b>	292 (218-368)	598 (322-1,319)	829 (365-1,869)	1,470 (794-2,420)	961 (535-2,278)
<b>PCR, ng/ml</b>	0.16 (0.02-0.59)	0.34 (0.03-1.70)	0.32 (0.04-2.02)	0.46 (0.05-2.38)	0.28 (0.05-1.97)
<b>Ferritina, ng/ml</b>	114.5 (28.5-298.0)	1857.0 (282.7-9,838.0)	248.2 (43.2-1,637.0)	379.3 (103.1-2,038.0)	518.2 (93.1-2,639.0)
<b>Ferro sérico, ng/ml</b>	89.5 (50.0-179.0)	214.0 (68.0-288.0)	98.5 (39.0-212.0)	127.0 (53.0-281.0)	108.0 (50.0-194.0)
<b>Sat Tf, %</b>	29.5 (14.0-46.0)	85.0 (21.0-100.0)	31.5 (15.0-100.00)	59.0 (22.0-100.0)	45.5 (17.0-100.0)
<b>GDF-15, pg/ml</b>	243.3 (121.0-452.1)	7,834.0 (4,690.0-13,865.0)	932.7 (287.0-11,161.0)	2,883.0 (914.9-11,478.0)	1,129.0 (535.2-15,611.0)
<b>Pro-hepcidina, ng/ml</b>	746.5 (384.6-3,972.0)	167.1 (20.9-627.9)	193.3 (58.7-600.0)	185.6 (38.1-2,963)	145.5 (0.6-534.9)
<b>Hepcidina, ng/ml</b>	73.9 (11.9-186.7)	35.2 (<5.0-176.8)	24.5 (<5.0-92.0)	33.3 (<5.0-401.9)	26.7 (5.1-445.2)
<b>IL-6, pg/ml</b>	0.75 (0.07-1.88)	1.16 (0.22-3.29)	0.88 (0.11-9.93)	1.53 (0.81-3.45)	1.27 (0.50-3.91)

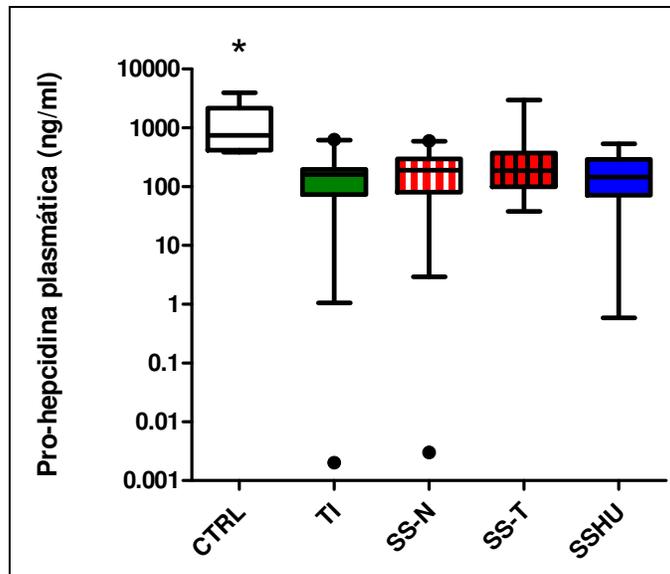
Valores expressos como Mediana (Mínimo-Máximo); CTRL, controles, TI, talassemia intermediária, SS-N, anemia falciforme sem uso de hidroxiureia e não politransfundido, SS-T, anemia falciforme sem hidroxiureia e politransfundido, SSHU, anemia falciforme em uso crônico de hidroxiureia, VCM, volume corpuscular médio, HCM, hemoglobina corpuscular média, céls, células, LDH, desidrogenase láctica, PCR, proteína C reativa, Sat Tf, saturação de transferrina, GDF-15, fator de crescimento e diferenciação 15, IL-6, interleucina 6.

Tendo o GDF-15 sido caracterizado na literatura como inibidor da produção de hepcidina, foram avaliados os níveis de pro-hepcidina plasmática e de hepcidina, representados nas Figuras 5 e 6, respectivamente.

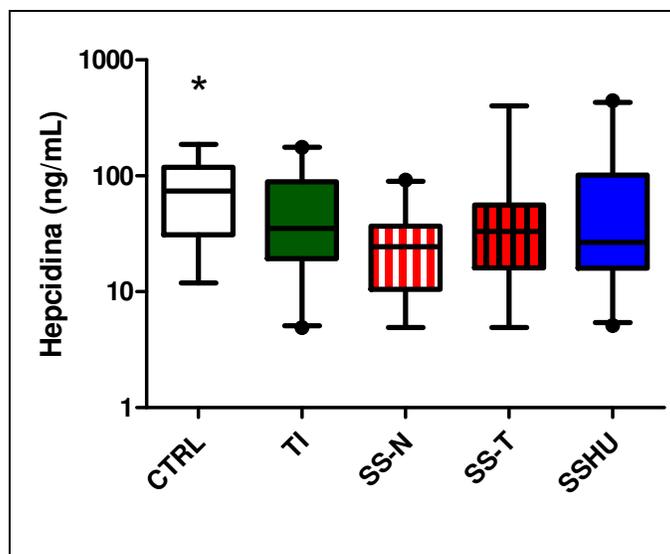


**Figura 4** - Níveis plasmáticos de GDF-15 em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20), anemia falciforme sem hidroxiureia não politransfundido (SS-N, n=22), sem hidroxiureia politransfundido (SS-T, n=14) e com hidroxiureia (SSHU, n=17), \* $p < 0.0001$  (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas, percentis 25 e 75, máximos e mínimos.

Os dados obtidos mostraram que ambos os grupos de pacientes apresentaram níveis significativamente elevados de GDF-15 plasmático quando comparados ao grupo de indivíduos controles, porém os níveis encontrados em talassemia foram mais elevados que os de pacientes com anemia falciforme (Figura 4).



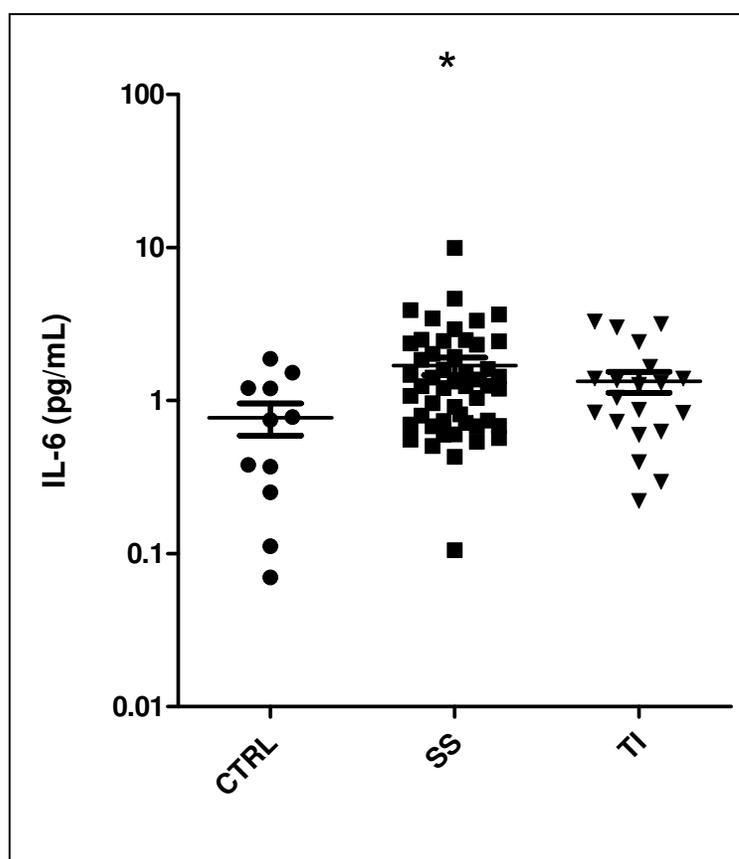
**Figura 5** - Níveis de pro-hepcidina plasmática em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20), anemia falciforme sem hidroxiureia não politransfundido (SS-N, n=22), sem hidroxiureia politransfundido (SS-T, n=14) e com hidroxiureia (SSHU, n=17) \* $p=0.0012$  (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas e percentis 25 e 75, sendo os pontos destacados os valores acima do percentil 95 ou abaixo do percentil 5.



**Figura 6** - Níveis séricos de hepcidina em indivíduos saudáveis (CTRL, n=17), pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária (TI, n=20) e anemia falciforme divididos por subgrupo (SS-N, n=22, SS-T, n=14, SSHU, n=17), \* $p=0.030$  (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa medianas e percentis 25 e 75, sendo os pontos destacados os valores acima do percentil 95 ou abaixo do percentil 5.

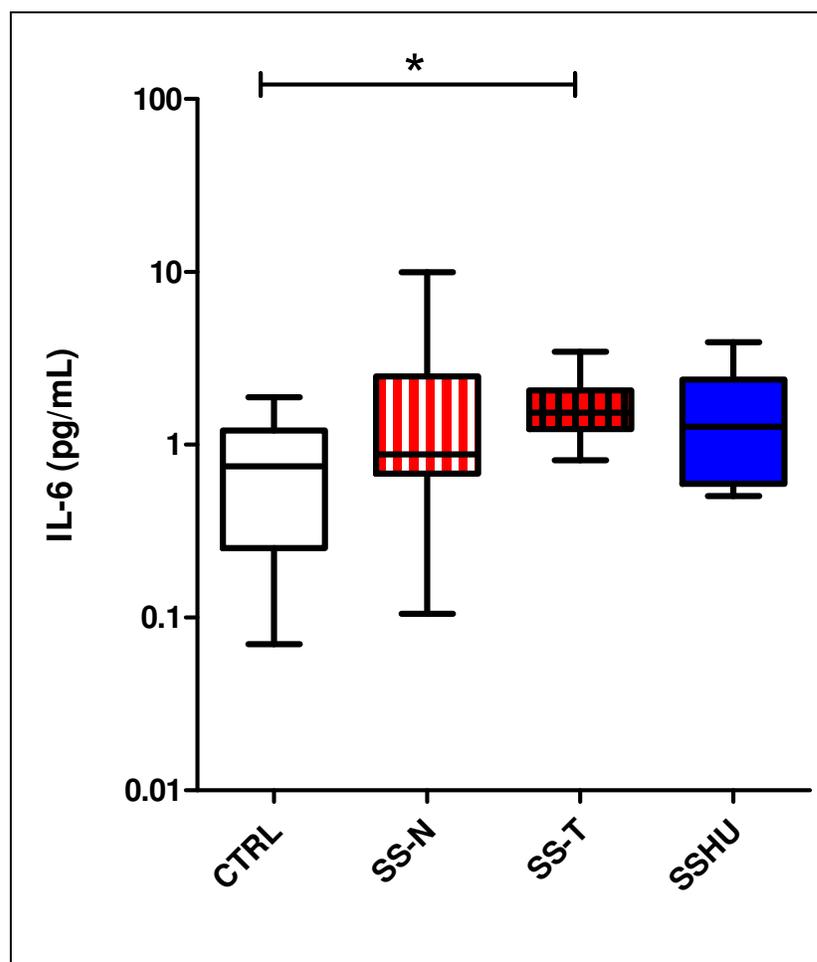
Sendo o GDF-15 um supressor da transcrição do gene codificador da hepcidina, avaliaram-se os níveis circulantes tanto da forma precursora pro-hepcidina, quanto do peptídeo maduro. Notou-se que tanto ambas formas tiveram seus níveis diminuídos nos grupos portadores de hemoglobinopatias, quando comparados aos controles, porém os níveis de hepcidina foram discretamente mais baixos nos pacientes com anemia falciforme. Não houve diferença entre os níveis de pro-hepcidina dos grupos com hemoglobinopatias, e não se observou correlação entre os níveis de hepcidina e pro-hepcidina.

Os níveis da citocina estimuladora da produção de hepcidina IL-6 também foram avaliados, e foram significativamente maiores nos pacientes com anemia falciforme (média  $1.69 \pm 0.22$  pg/ml) do que nos grupos controle (média  $0.77 \pm 0.18$  pg/ml) e de pacientes portadores de talassemia intermediária (média  $1.33 \pm 0.21$  pg/ml), como mostra a Figura 7.



**Figura 7** - Níveis séricos de IL-6 em controles (CTRL, n=11), pacientes com anemia falciforme (SS, n=50) e talassemia intermediária (TI, n=20), \*p=0.0474 (ANOVA e Dunnett).

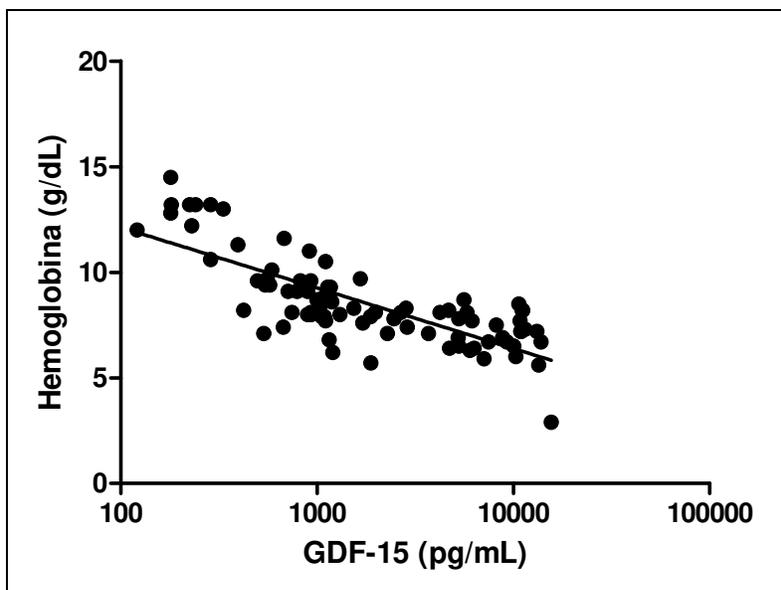
A análise dos pacientes com anemia falciforme estratificados em função do histórico transfusional e tratamento mostrou que o grupo de pacientes sem hidroxiureia, porém com histórico acima de 20 CH (SS-T) apresentou níveis significativamente mais altos de IL-6 que os controles (Figura 8).



**Figura 8** - Níveis séricos de IL-6 em controles (CTRL, n=11), pacientes com anemia falciforme sem hidroxiureia e histórico de até 20 CH (SS-N, n=18), pacientes sem hidroxiureia e histórico de mais de 20 CH (SS-T, n=14) e pacientes em uso de hidroxiureia (SSHU, n=18), \*p=0.0283 (ANOVA e Dunnett). O gráfico representa valores máximos, mínimos, medianas e quartis.

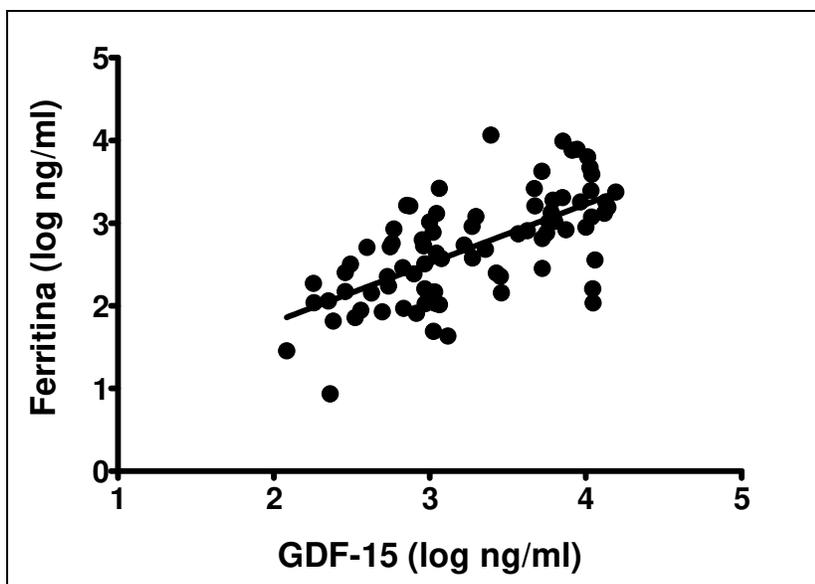
## 4.2 Correlações entre GDF-15 e níveis de hemoglobina e ferritina sérica

Neste estudo, na avaliação global de pacientes e controles, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de hemoglobina e de GDF-15 plasmático, conforme destacado na Figura 9.



**Figura 9** - Correlação entre níveis de Hb e de GDF-15 plasmático ( $r_s=-0.7511$ ,  $p<0.0001$ ).

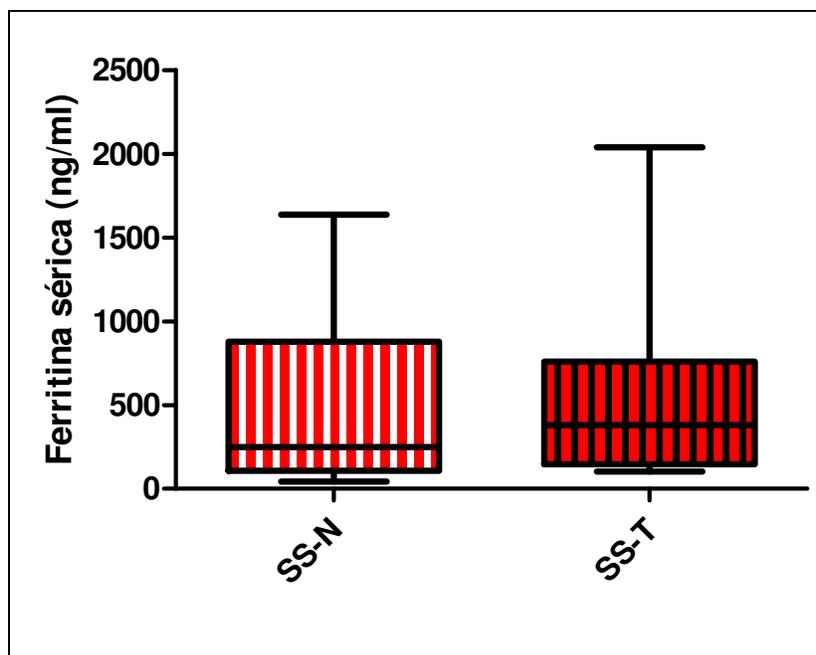
Foi observada uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de GDF-15 e os níveis séricos de ferritina, como mostra a Figura 10.



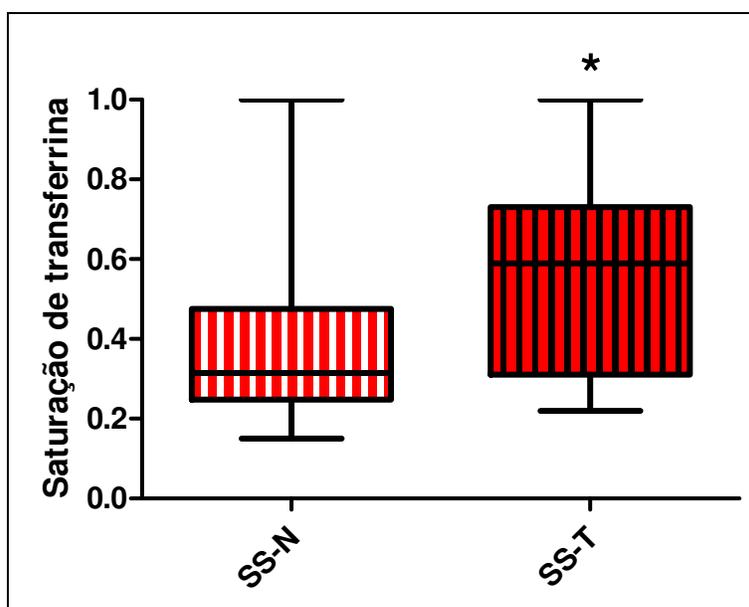
**Figura 10** - Correlação entre níveis de ferritina sérica e de GDF-15 plasmático ( $r_s=0.6301$ ,  $p<0.0001$ ).

#### **4.3 Análise comparativa dos marcadores de sobrecarga de ferro nos pacientes com anemia falciforme em função do histórico transfusional**

Os níveis de ferritina sérica e de saturação de transferrina de ambos os grupos foram comparados, como mostram as Figuras 11 e 12. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos na avaliação dos níveis de ferritina sérica, porém os níveis de saturação de transferrina encontrados estiveram significativamente elevados no grupo com histórico transfusional acima de 20 CH prévios em relação ao grupo menos transfundido.



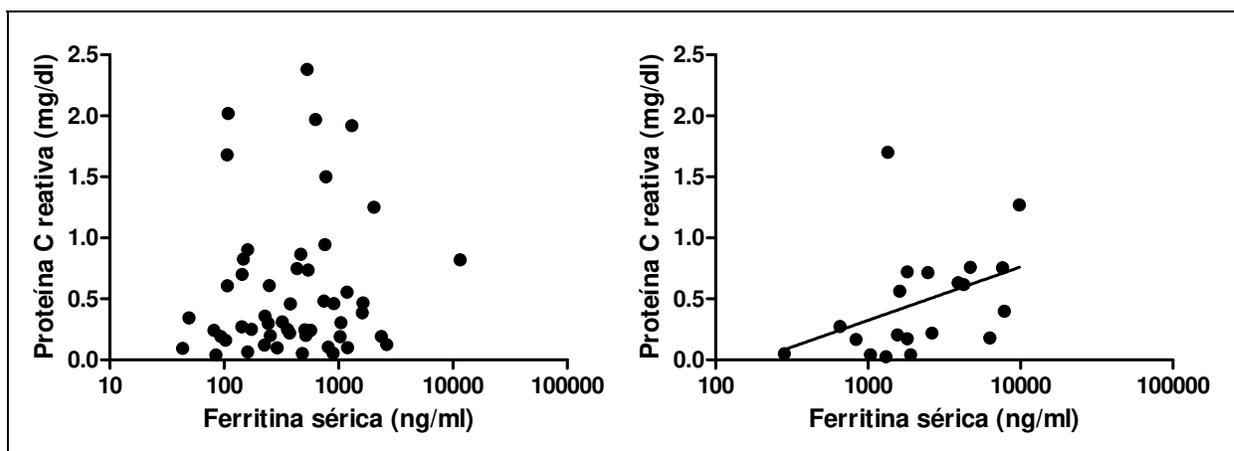
**Figura 11** - Níveis de ferritina sérica em pacientes com anemia falciforme sem tratamento com HU, com histórico de transfusão de até 20 (n=22) ou mais de 20 concentrados de hemácias prévios (n=14),  $p=0.34$  (Mann-Whitney).



**Figura 12** - Níveis de saturação de transferrina em pacientes com anemia falciforme sem tratamento com hidroxiureia, com histórico de transfusão de até 20 (SS-N, n=22) ou mais de 20 concentrados de hemácias prévios (SS-T, n=14),  $*p=0.045$  (Mann-Whitney).

#### 4.4 Correlação entre proteína C reativa sérica e ferritina sérica

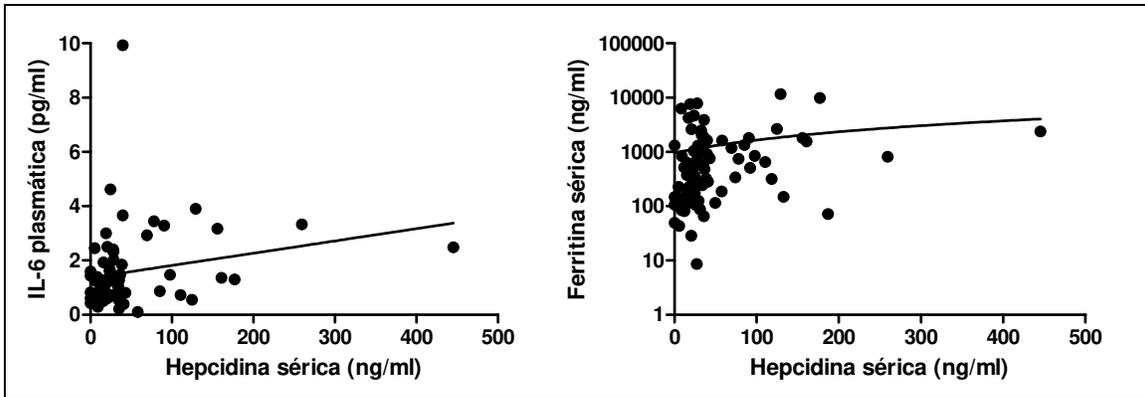
Sendo a anemia falciforme reconhecida como um estado inflamatório crônico entre os pacientes, foi utilizada a dosagem de proteína C reativa como um marcador sérico inespecífico de atividade inflamatória. A relação entre os níveis de proteína C reativa e de ferritina sérica foi avaliada pela possível indução da produção de ferritina como proteína de fase aguda, mas nenhuma correlação com significância estatística foi constatada, possivelmente pela heterogeneidade da intensidade da atividade inflamatória (Figura 13, à esquerda). No entanto, nos pacientes com talassemia intermediária, em que a inflamação não varia em função da doença de base, manteve-se correlação entre proteína C reativa e níveis de ferritina (Figura 13, à direita).



**Figura 13** - Correlação entre os níveis de ferritina sérica e de proteína C reativa nos pacientes com anemia falciforme (à esquerda, n=53),  $p > 0.05$  (Spearman) e nos pacientes com talassemia beta intermediária (à direita, n=20),  $p = 0.0187$ ,  $r_s = 0.5203$ .

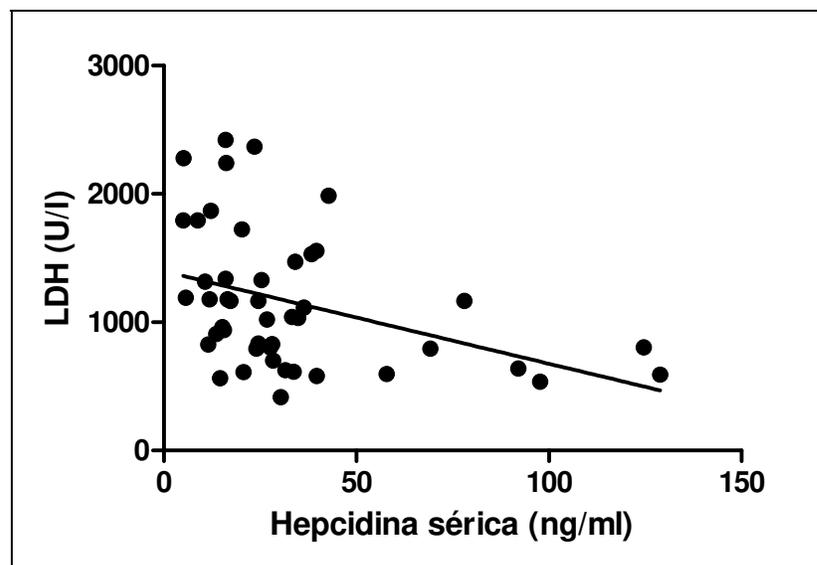
#### 4.5 Estudos de correlação entre níveis de hepcidina sérica, GDF-15 plasmático, IL-6 plasmática, ferritina sérica e desidrogenase láctica sérica

Nos estudos de correlação, não houve significância estatística correlacionando-se os níveis de hepcidina circulante e de GDF-15 plasmático. Porém, houve correlação positiva da hepcidina com a quantidade de IL-6 circulante e com os níveis de ferritina sérica, como mostra a Figura 14.



**Figura 14** - Correlações entre IL-6 plasmática (à esquerda) e ferritina sérica (à direita) com hepcidina sérica (n=73),  $p=0.0392$ ,  $r_s=0.2489$  para IL-6,  $p=0.0005$ ,  $r_s=0.3753$  para ferritina.

No grupo de pacientes com anemia falciforme, foi observada uma correlação negativa entre os níveis de lactato desidrogenase e os de hepcidina, conforme a Figura 15.

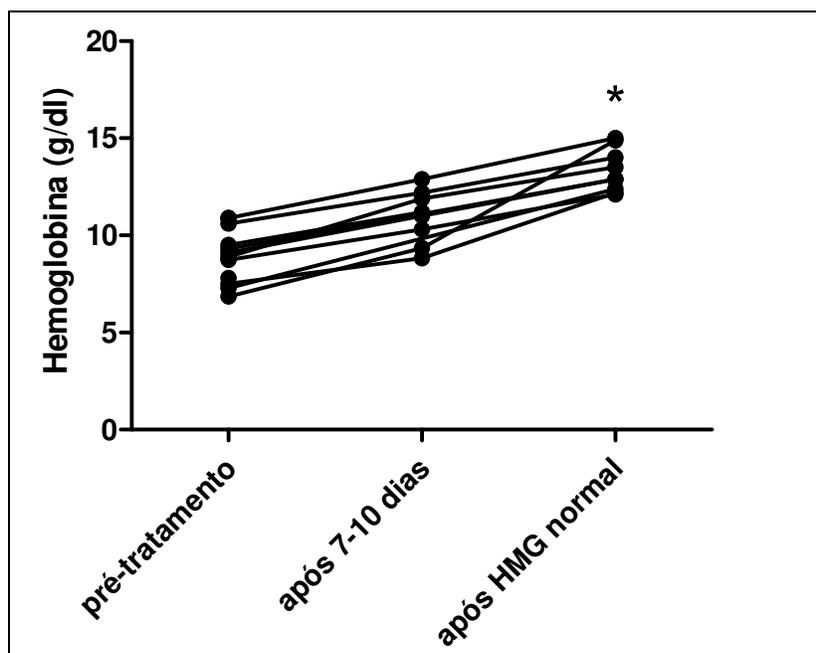


**Figura 15** - Correlação entre níveis de desidrogenase láctica (LDH) e hepcidina sérica em pacientes com anemia falciforme,  $p=0.002$ ,  $r_s=-0.4444$ .

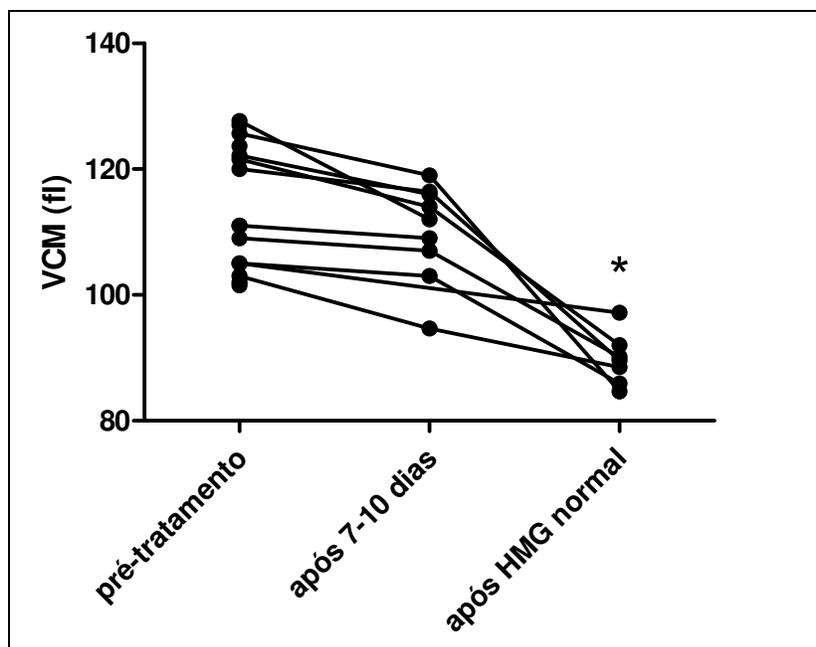
#### 4.6 Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – dados hematológicos

Para comparação da talassemia  $\beta$  intermediária com outro tipo de anemia em que ocorre eritropoese ineficaz, foram estudados 14 pacientes com diagnóstico de anemia por deficiência de B12. As amostras analisadas foram coletadas ao diagnóstico, 7 a 10 dias após o início da reposição de cianocobalamina por via intramuscular, e após completa normalização do hemograma.

A Figura 16 mostra a evolução dos níveis de hemoglobina (Hb). Conforme o esperado, os pacientes apresentaram elevação progressiva da Hb, embora o aumento não seja estatisticamente significativo no início, com apenas 7 a 10 dias de tratamento. O volume corpuscular médio das hemácias (VCM), caracteristicamente elevado nas anemias por deficiência de cobalamina, apresentou normalização progressiva com o tratamento de reposição, conforme mostra a Figura 17.



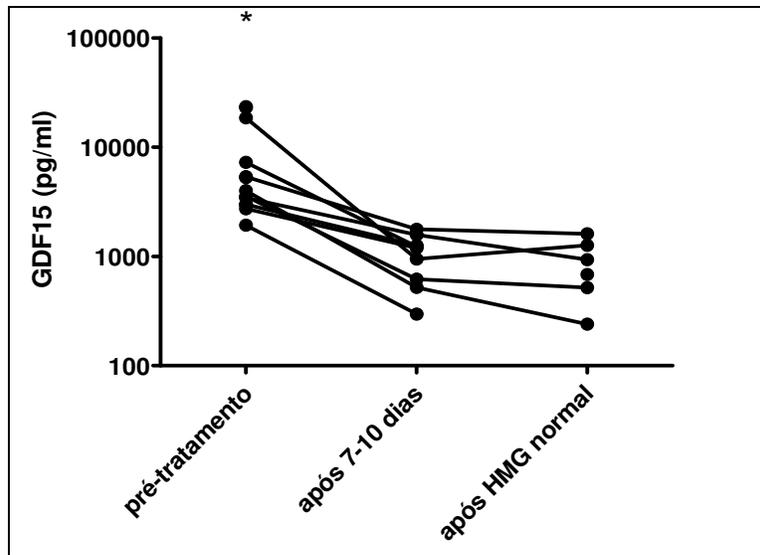
**Figura 16** - Níveis de hemoglobina dos pacientes com deficiência de vitamina B12 durante o estudo, \* $p=0.0009$  (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear  $p<0.0001$ ), HMG, hemograma



**Figura 17** - Medida de volume corpuscular médio dos pacientes com deficiência de vitamina B12 durante o estudo, \* $p=0.0004$  (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear  $p<0.0001$ ), HMG, hemograma

#### 4.7 Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – níveis de GDF-15 plasmático

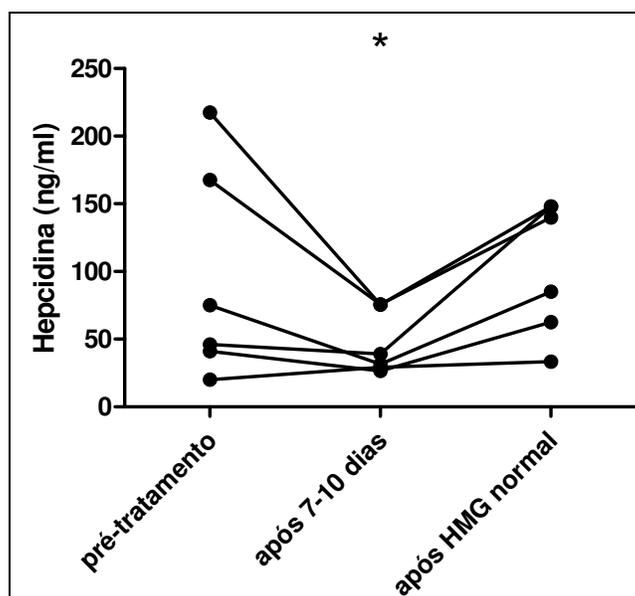
Em relação aos níveis de GDF-15 plasmático, a Figura 18 mostra que os níveis inicialmente elevados apresentaram rápida e acentuada queda logo na primeira semana de tratamento:



**Figura 18** - Níveis de GDF-15 plasmático dos pacientes com deficiência de B12 durante o estudo, \* $p < 0.0001$  (Kruskal-Wallis e Dunn, pós-teste para tendência linear  $p = 0.017$ ), HMG, hemograma

#### 4.8 Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – níveis de hepcidina plasmática

Na avaliação da produção de hepcidina sistêmica desses pacientes, observou-se que os níveis médios de hepcidina plasmática ao diagnóstico, 7 a 10 dias após o início do tratamento e após a normalização do hemograma foram, respectivamente,  $108.80 \pm 23.36 \text{ ng/ml}$ ,  $59.37 \pm 16.23 \text{ ng/ml}$  e  $102.9 \pm 20.16 \text{ ng/ml}$ . Na sub-análise dos pacientes em que foi possível obter as 3 amostras de forma seriada ( $n=6$ ), notou-se um decréscimo da produção dessa proteína no período logo após o início do tratamento, seguido de recuperação para níveis semelhantes aos encontrados ao diagnóstico, conforme mostra a Figura 19.



**Figura 19** - Níveis de hepcidina plasmática dos pacientes com deficiência de B12 durante o estudo, \*p=0.0454 (Repeated measures ANOVA e Bonferroni), HMG, hemograma

#### 4.9 Estudo de pacientes com anemia por deficiência de B12 – resumo dos dados laboratoriais

A seguir, a Tabela IV resume os dados laboratoriais dessa população ao diagnóstico, após 7-10 dias de tratamento e após normalização do hemograma.

**Tabela 4** - Dados laboratoriais dos pacientes diagnosticados com deficiência de cobalamina

Parâmetros	Ao diagnóstico, pré-tratamento <i>(n=14)</i>	Após 7 a 10 dias de tratamento <i>(n≥6)</i>	Após normalização do hemograma <i>(n≥6)</i>
Hemoglobina (g/dl)	8.8 (1.5)	10.4 (1.6)	13.0 (1.2)
Hematócrito (%)	27.3 (6.0)	31.3 (4.5)	40.0 (3.9)
VCM (fl)	114.4 (9.9)	110.1 (7.7)	91.4 (6.1)
HCM (pg)	39.1 (3.5)	36.6 (3.1)	29.8 (2.2)
Retic (cél/mm <sup>3</sup> )	72,972 (49,464)	141,494 (100,111)	50,540 (28,101)
LDH (U/l)	1,959 (2,288)	NR	NR
Ferritina (ng/ml)	227.2 (149.3)	NR	NR
Ferro sérico (ng/ml)	85.5 (12.3)	NR	NR
Sat Tf(%)	33.0 (1.7)	NR	NR
Cobalamina sérica (pg/ml)	81.5 (50.9)	NR	NR
Hepcidina plasmática (ng/ml)	108.80 (23.36)	59.37 (16.23)	102.9 (20.16)
GDF-15 plasmático (pg/ml)	8,057 (7,987)	1,047 (492)	876 (503)

Valores expressos como Média (Desvio-padrão); VCM, volume corpuscular médio, HCM, hemoglobina corpuscular média, Retic, reticulócitos, células, LDH, desidrogenase lática, Sat Tf, saturação de transferrina, GDF-15, fator de crescimento e diferenciação 15, NR, não realizado

#### 4.10 Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – dados clínico-laboratoriais

No estudo dos pacientes com hemólise crônica por outras causas, incluímos pacientes com os diagnósticos de esferocitose hereditária - 5 pacientes, anemia hemolítica autoimune em atividade - 3 pacientes, anemia hemolítica crônica não-esferocítica, anemia hemolítica pós-infecção viral e deficiência de pirimidina 5'-nucleotidase – 1 paciente de cada, sendo 6 homens e 7 mulheres, com idades de 19 a 64 anos. A Tabela V resume os dados laboratoriais desta população.

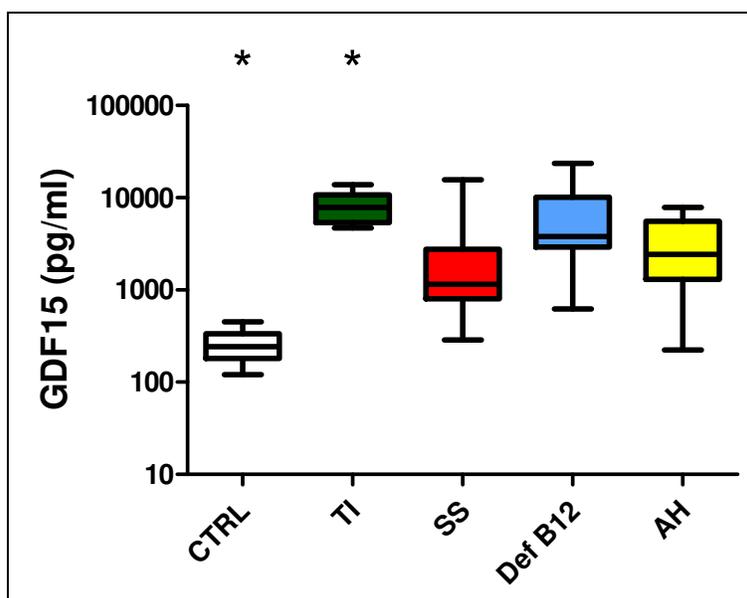
**Tabela 5** - Dados laboratoriais dos pacientes com hemólise crônica de outras causas

<b>Parâmetros</b>	<b>Valores</b> <i>(n=13)</i>
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	12.7 (3.0) [9.1-16.9]
<b>Hematócrito (%)</b>	37.5 (8.8) [26.7-54.8]
<b>VCM (fl)</b>	88.0 (13.7) [71.6-116.1]
<b>HCM (pg)</b>	29.7 (3.8) [23.7-35.6]
<b>Retic (cél/mm<sup>3</sup>)</b>	257,528 (105,208) [97,500-463,000]
<b>Hepcidina plasmática (ng/ml)</b>	122.7 (43.2) [59.0-218.0]
<b>GDF-15 plasmático (pg/ml)</b>	2529.6 (2392.3) [20.4-7881.8]

Valores expressos como Média (Desvio-padrão) [mínimo-máximo]; VCM, volume corpuscular médio, HCM, hemoglobina corpuscular média, Retic, reticulócitos, GDF-15, fator de crescimento e diferenciação 15

#### **4.11.- Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – níveis de GDF-15 plasmático**

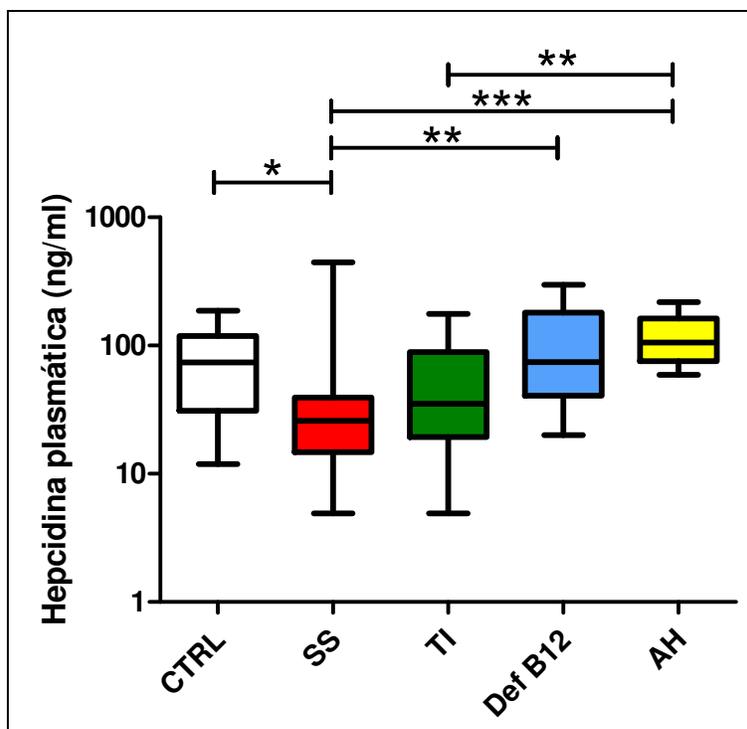
Observamos aumento dos níveis de GDF-15 plasmático, semelhantemente ao observado na anemia falciforme, porém inferiores aos encontrados em talassêmicos e pacientes com carência de vitamina B12. A Figura 20 mostra uma comparação entre os níveis dos indivíduos controles e das populações estudadas.



**Figura 20** - Níveis de GDF-15 plasmático de controles (CTRL, n=14), talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=53), deficiência de cobalamina (Def B12, n=14) e hemólise crônica de outras causas (AH, n=13), \*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett).

#### 4.12 Estudo de pacientes com hemólise crônica por outras causas – níveis de hepcidina plasmática

Semelhantemente ao observado na anemia megaloblástica, e contrariamente ao observado nas hemoglobinopatias em geral, os pacientes com hemólise crônica de outras causas não apresentaram supressão dos níveis de hepcidina plasmática (média de  $120.7 \pm 50.3$  ng/ml), como mostra a Figura 21.

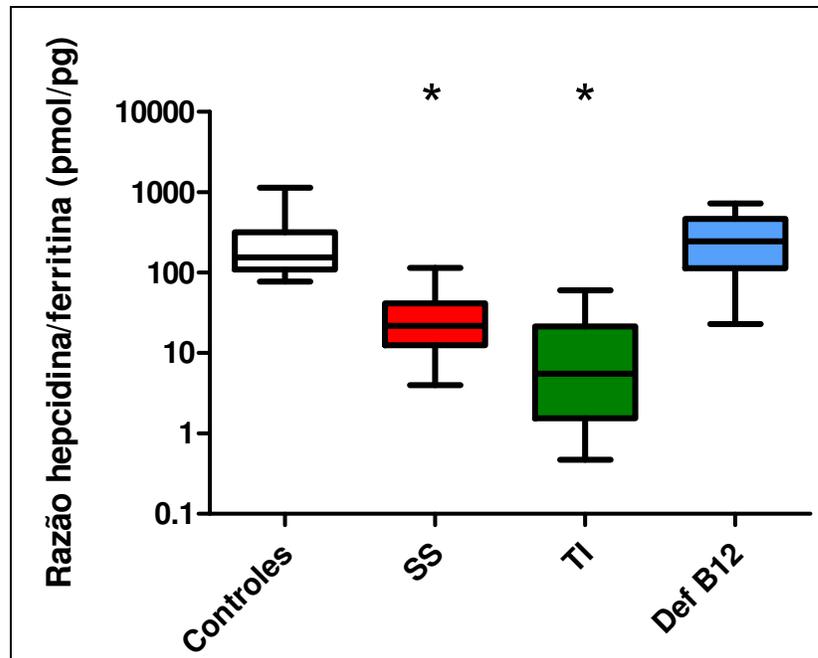


**Figura 21** - Níveis de hepcidina plasmática de controles (CTRL, n=14), talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=53), deficiência de cobalamina (Def B12, n=14) e hemólise crônica de outras causas (AH, n=13). Dados expressos como valores máximo/mínimo e quartis, \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett).

#### 4.13.- Estudo das razões hepcidina/ferritina e pro-hepcidina/ferritina

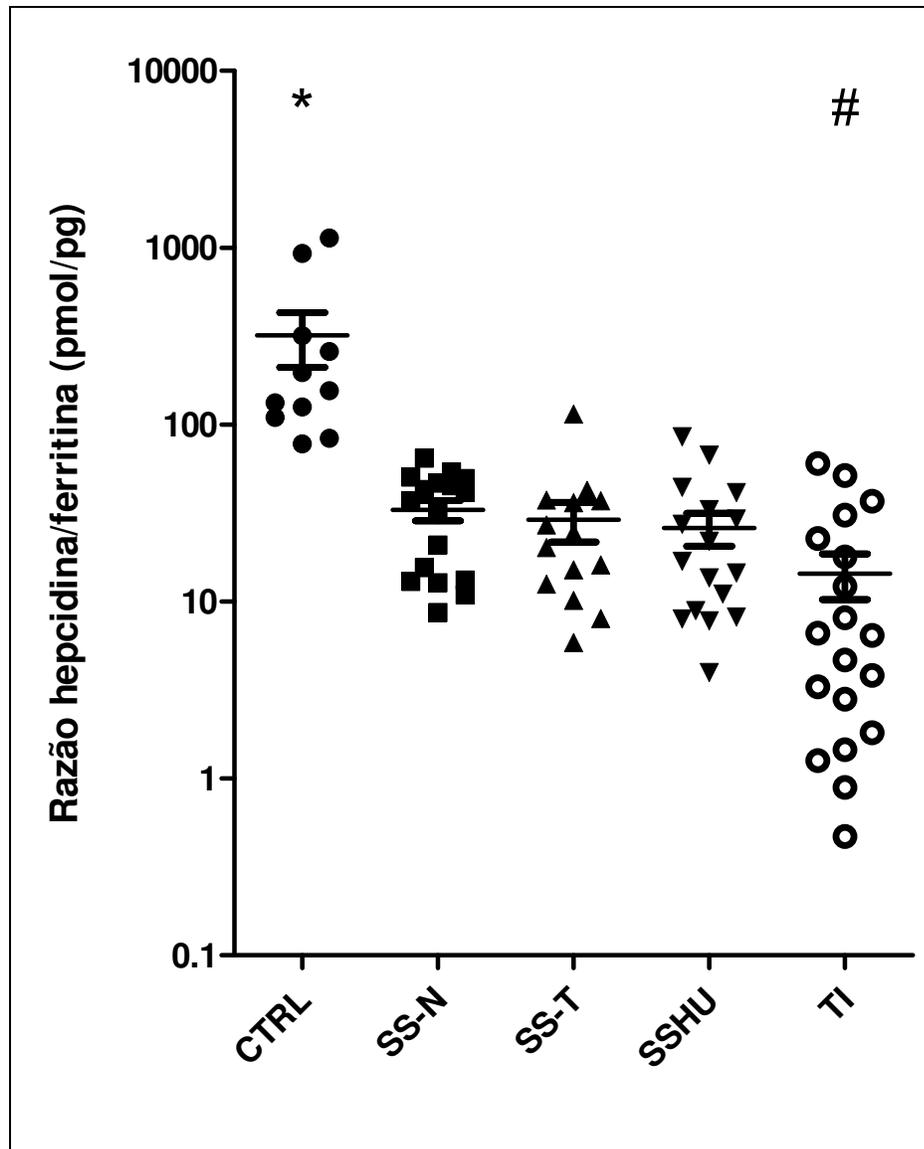
Também foram estudadas as razões hepcidina/ferritina e pro-hepcidina/ferritina, como forma de avaliar as produções de hepcidina ou de pro-hepcidina sistêmicas corrigidas em função do estoque corporal de ferro.

Na Figura 22, estão os valores da razão hepcidina/ferritina das hemoglobinopatias comparadas com o grupo de anemia por deficiência de B12.



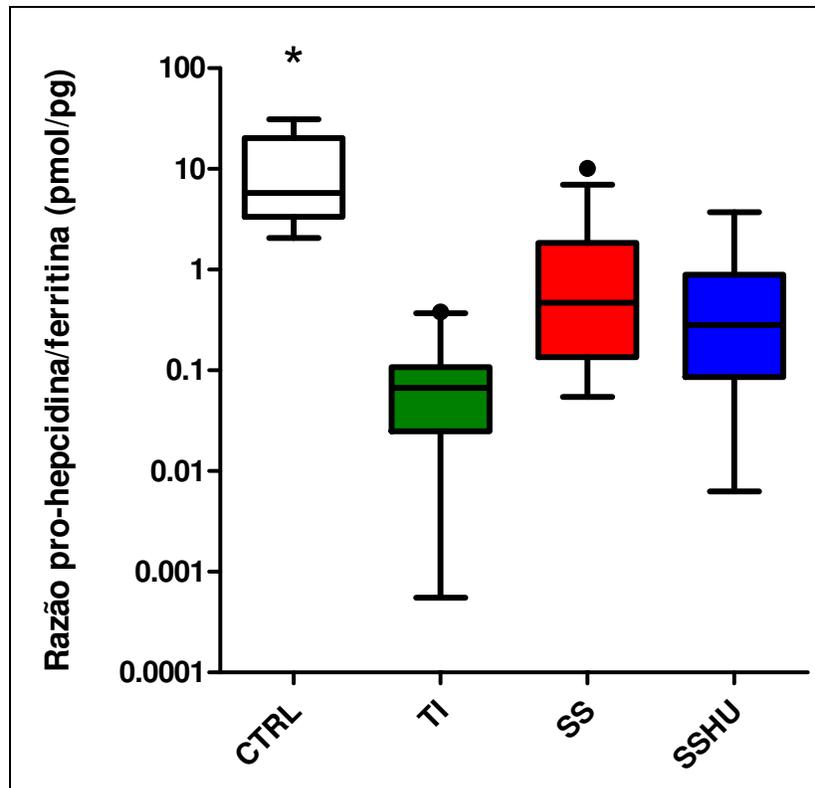
**Figura 22** - Razão hepcidina/ferritina em controles (n=11), pacientes com anemia falciforme (SS, n=51), pacientes com talassemia intermediária (TI, n=20), e pacientes com anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 (Def B12, n=13), \*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett).

Na Figura 23, os valores da razão hepcidina/ferritina foram comparados nos três grupos de pacientes com anemia falciforme em função do histórico transfusional e uso de hidroxiureia.



**Figura 23** - Razão hepcidina/ferritina em pacientes com anemia falciforme sem hidroxiureia com até 20 transfusões prévias (SS-N, n=19), anemia falciforme sem hidroxiureia com mais de 20 transfusões prévias (SS-T, n=15), anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=17) e talassemia intermediária (TI, n=20), em comparação com controles sem hemoglobinopatia (CTRL, n=11), \* $p < 0.0001$  (ANOVA), # $p < 0.05$  (TI vs. SS-N),  $p > 0.05$  para os grupos SS entre si (Dunnett).

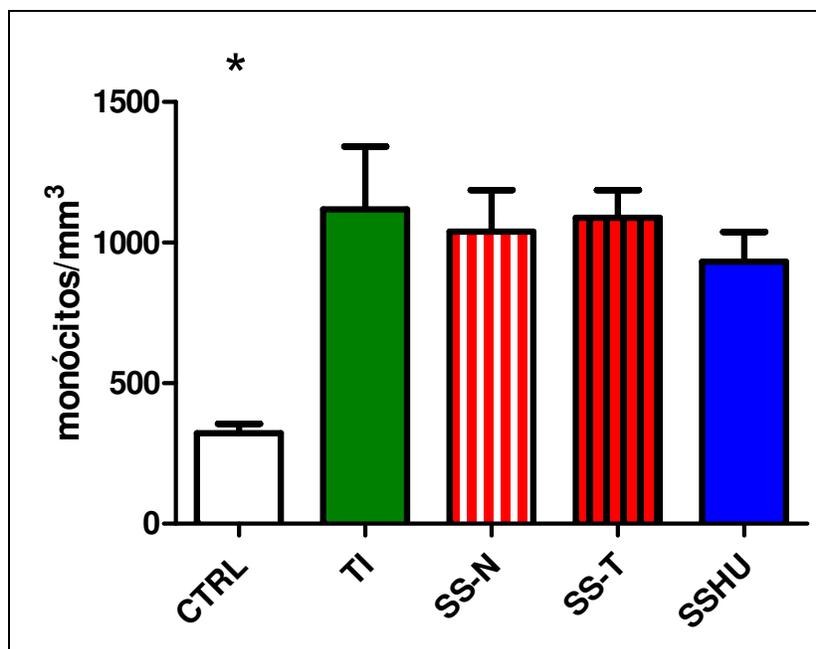
Na Figura 24, estão representadas as razões pro-hepcidina/ferritina nos diferentes grupos.



**Figura 24** - Razão pro-hepcidina/ferritina em pacientes com talassemia intermediária (TI, n=20), anemia falciforme (SS, n=33), e anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=15), em comparação com controles sem hemoglobinopatia (CTRL, n=8), \*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). Os pontos pretos representam valores abaixo do percentil 5 ou acima do percentil 95 da população.

#### 4.14 Contagens de monócitos em sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias

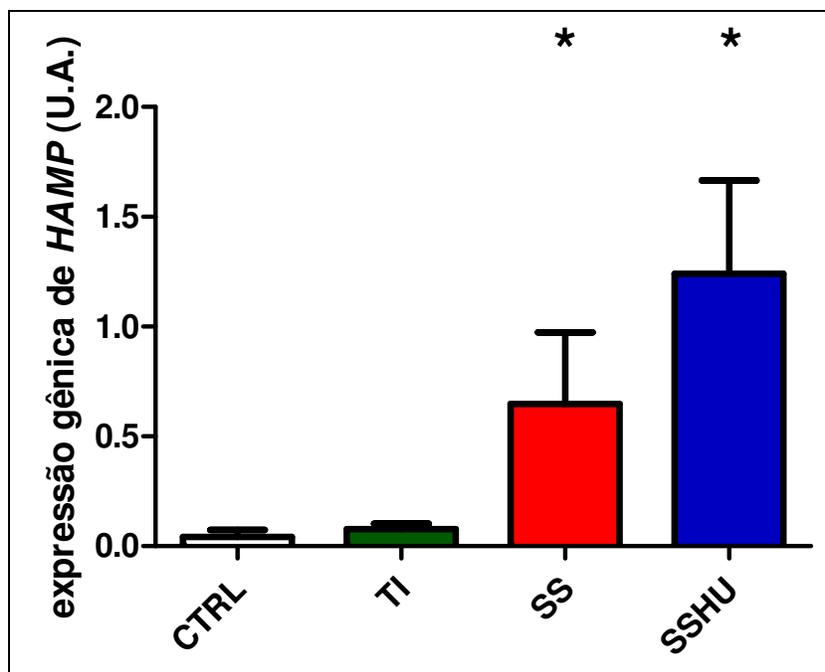
No estudo da hepcidina em monócitos, avaliamos inicialmente as contagens diferenciais dos leucócitos nos hemogramas, que demonstraram monocitose em todos os grupos de pacientes com hemoglobinopatias em comparação com o habitualmente encontrado em indivíduos controle, conforme destacado na Figura 25.



**Figura 25** - Contagem absoluta média de monócitos no sangue periférico de controles (CTRL, n=13) e pacientes com anemia falciforme sem hidroxiureia com até 20 transfusões prévias (SS-N, n=18), anemia falciforme sem hidroxiureia com mais de 20 transfusões prévias (SS-T, n=17), anemia falciforme em uso de HU (SSHU, n=18) e talassemia intermediária (TI, n=20), \*p<0.001 (ANOVA e Dunnett).

#### 4.15 Expressão do gene *HAMP* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias

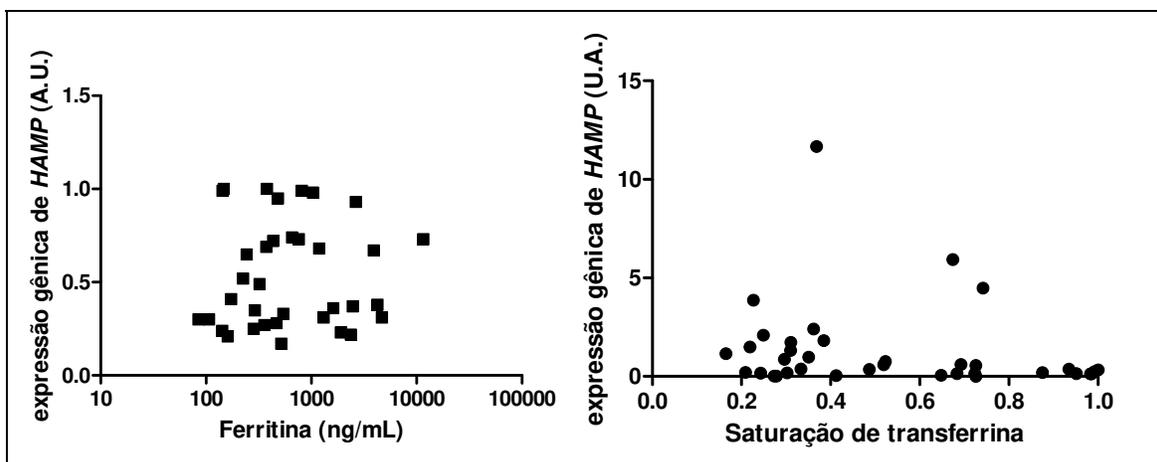
Após a separação dos monócitos do sangue periférico, amostras do cDNA foram utilizadas para avaliação comparativa da expressão do gene *HAMP*, codificador da hepcidina, em monócitos. A seguir, a Figura 26 mostra que, embora a expressão de hepcidina monocítica seja muito baixa tanto na população de controles, quanto na de pacientes portadores de talassemia intermediária, ela está evidentemente aumentada nos pacientes com anemia falciforme, e em particular, no grupo de pacientes em tratamento com hidroxiureia.



**Figura 26** - Expressão gênica média de hepcidina (gene *HAMP*) em monócitos no sangue periférico de controles (CTRL, n=13) e pacientes subdivididos por grupo (TI, talassemia intermediária, n=20, SS, anemia falciforme sem uso de hidroxiureia, n=35, SSHU, anemia falciforme com hidroxiureia, n=18), \*p=0.0209 (Kruskal-Wallis e Dunn).

#### 4.16 Correlações entre níveis de expressão do gene *HAMP* em monócitos de sangue periférico de pacientes com hemoglobinopatias, níveis de saturação de transferrina e ferritina sérica

Os estudos de correlação dos níveis de expressão gênica de hepcidina monocítica com os níveis de ferritina e saturação de transferrina não demonstraram qualquer relação entre essas medidas (Figura 27).

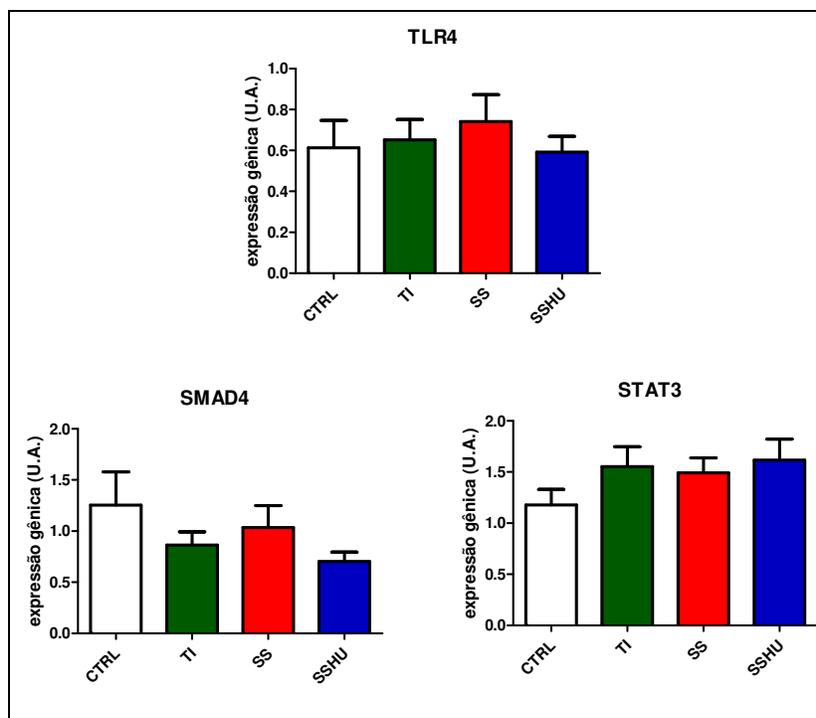


**Figura 27** - Correlações entre expressão gênica de hepcidina em monócitos e níveis de ferritina sérica (à esquerda) e saturação de transferrina (à direita) em todos os pacientes (n=73),  $p > 0.05$  (Spearman). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica.

#### 4.17 Níveis de expressão de genes envolvidos na regulação de expressão de *HAMP* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias

Foram estudadas as expressões em monócitos de três genes envolvidos na regulação da produção de hepcidina: *TLR4* (receptor de LPS), *STAT3* (transdutor do sinal ativado por IL-6) e *SMAD4* (transdutor do sinal mediado por BMP).

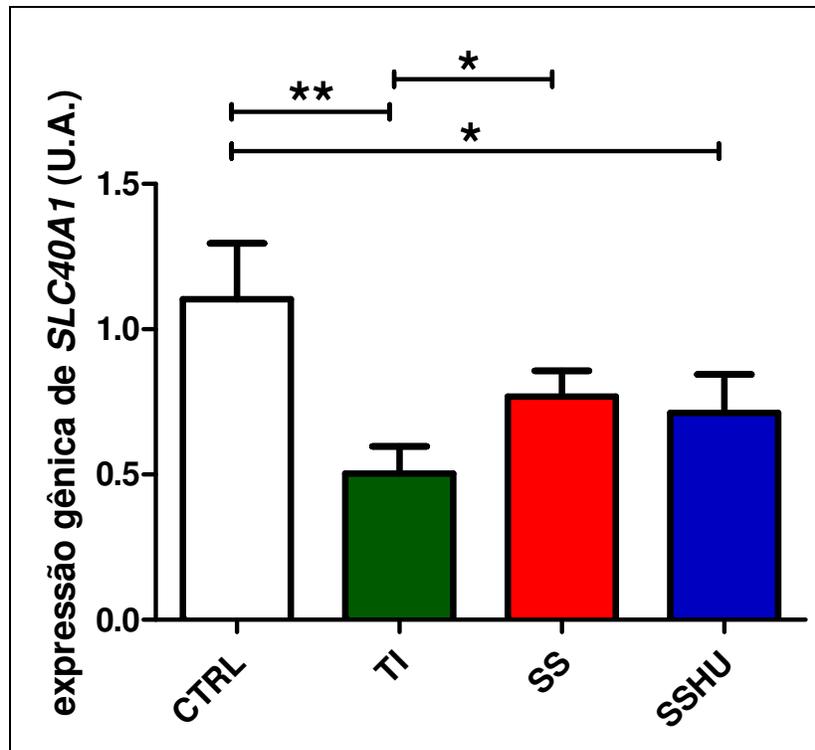
Não se observou diferença estatisticamente significativa entre as quantidades de RNAm de nenhum desses genes em monócitos de controles e de pacientes com hemoglobinopatias (Figura 28).



**Figura 28** - Expressão gênica dos genes *TLR4*, *SMAD4* e *STAT3* em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18,  $p>0.05$  (ANOVA). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica.

#### 4.18 Níveis de expressão do gene *SLC40A1* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias

Sendo a ferroportina o único transportador de ferro encontrado em células de mamíferos, e o principal alvo da ação da hepcidina, os níveis de expressão do gene que codifica esta proteína, *SLC40A1*, foram avaliados em monócitos de todos os grupos, conforme mostra a Figura 29.



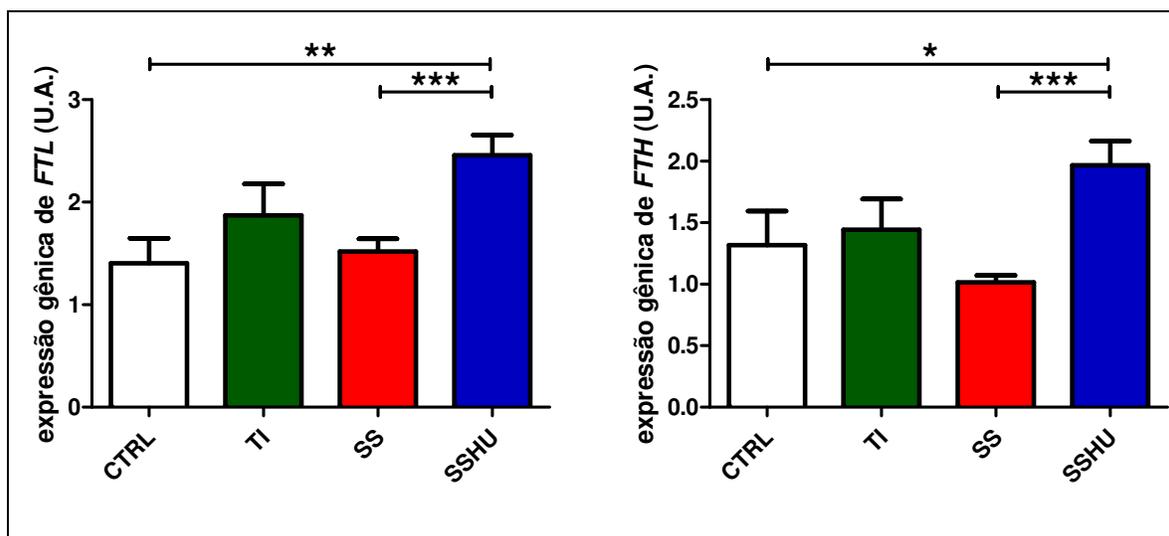
**Figura 29** - Expressão gênica de ferroportina (gene *SLC40A1*) em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18, \*p<0.05, \*\*p<0.001 (ANOVA e Dunnett). U.A., unidades arbitrárias **de expressão gênica**.

Os níveis mais baixos de expressão de ferroportina foram encontrados nos monócitos de pacientes portadores de talassemia  $\beta$  intermediária. Nos pacientes com anemia falciforme, os níveis também estavam diminuídos em comparação com o encontrado nos controles, porém não houve diferença em função do uso ou não de hidroxiureia.

#### **4.19.- Níveis de expressão dos genes *FTL* e *FTH* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com hemoglobinopatias**

A expressão de ferritina também foi avaliada nos monócitos, através da expressão dos genes que codificam as cadeias leves e pesadas que compõem essa molécula, *FTL* e *FTH*, respectivamente. Na Figura 30, observa-se um aumento da expressão de ambas cadeias nos monócitos de pacientes com anemia falciforme em uso de hidroxiureia em

relação aos controles. Houve uma tendência semelhante na comparação com pacientes com talassemia, porém não atingiu significância estatística.

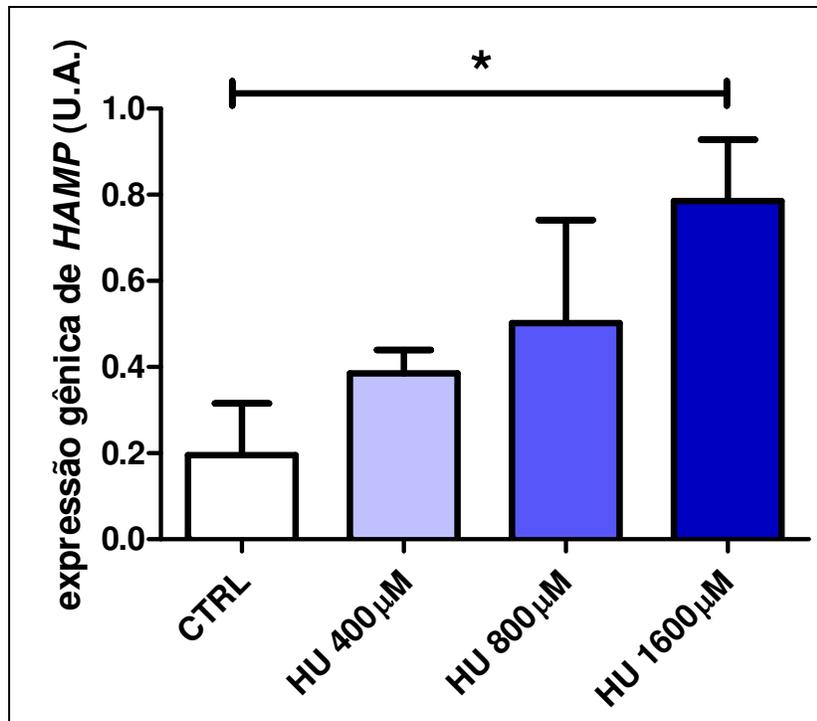


**Figura 30** - Expressão gênica de cadeia leve (gene *FTL*) e cadeia pesada (gene *FTH*) da ferritina em monócitos de controles e pacientes separados por grupo, CTRL, n=13; TI, n=20; SS, n=35; SSHU, n=18, \*p<0.05, \*\*p<0.001, \*\*\*p<0.0001 (ANOVA e Dunnett). U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica.

#### 4.20.- Níveis de expressão do gene *HAMP* em cultura de linhagem celular THP-1 tratada com hidroxiureia

Ainda em relação à expressão de hepcidina em células de origem monocítica, foi realizada a avaliação dos efeitos da hidroxiureia em células da linhagem celular humana imortalizada THP-1.

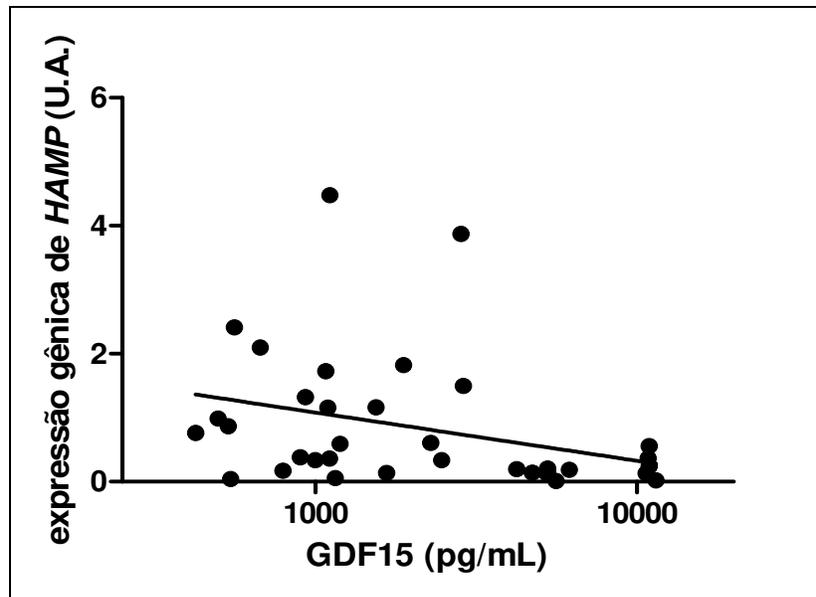
As células foram incubadas com concentrações de 400µM, 800µM e 1600µM de hidroxiureia, e incubação apenas com o veículo de diluição (água destilada). A análise da expressão do gene *HAMP* demonstrou que concentrações crescentes de HU foram capazes de aumentar a transcrição desse gene em até 4 vezes acima do observado com o veículo apenas, conforme mostrado na Figura 31.



**Figura 31** - Expressão gênica de *HAMP* em culturas de células THP-1 incubadas com concentrações crescentes de hidroxiureia (HU), n=4 para cada grupo, \*p=0.03 (teste t pareado). CTRL, cultura com veículo, U.A., unidades arbitrárias de expressão gênica.

#### 4.21 Correlação dos níveis de expressão do gene *HAMP* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com GDF-15 plasmático

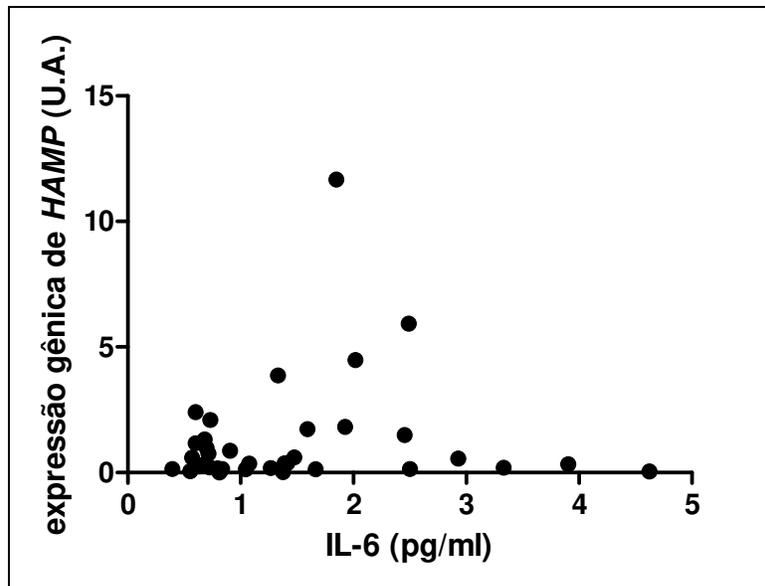
Em relação ao controle da expressão de hepcidina monocítica pelo GDF-15 plasmático, observou-se uma correlação negativa entre os níveis plasmáticos dessa citocina e a expressão de *HAMP* nos monócitos (Figura 32).



**Figura 32** - Correlação entre níveis de GDF-15 plasmático e expressão gênica de hepcidina em monócitos na população estudada. ( $p < 0.05$ ,  $r_s = 0.34$ )

#### 4.22 Correlação dos níveis de expressão do gene *HAMP* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com IL-6 plasmática

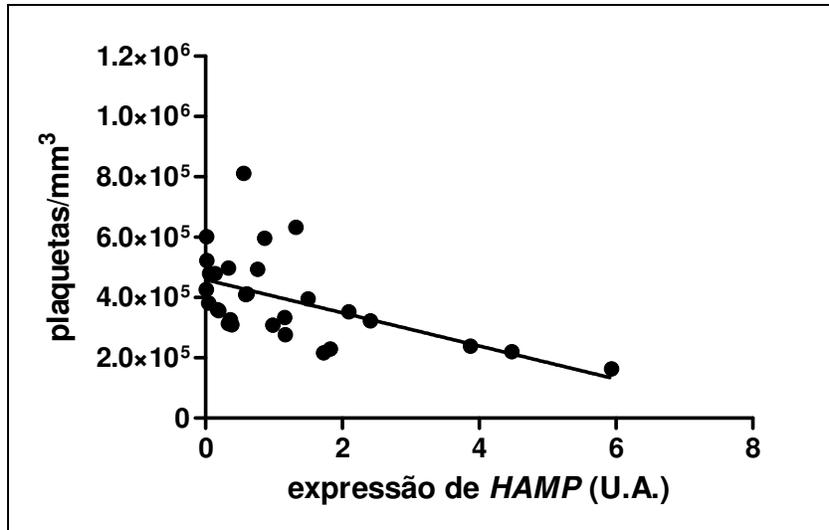
Embora haja correlação com o inibidor GDF-15, os níveis de IL-6, citocina estimuladora da expressão de hepcidina, não se correlacionaram com a expressão de hepcidina monocítica (Figura 33).



**Figura 33** - Correlação entre níveis de IL-6 plasmática e expressão gênica de hepcidina em monócitos,  $p=0.678$  (Spearman).

#### 4.23 Estudos de correlação dos níveis de expressão do gene *HAMP* em monócitos de sangue periférico de controles e pacientes com dados hematológicos e bioquímicos

Nos estudos de correlação da expressão de hepcidina monocítica (vide tabelas de coeficientes e valores de significância das correlações entre expressão gênica de hepcidina (*HAMP*) em monócitos e dados hematológicos e bioquímicos, nos Apêndices 1 e 2), notou-se que a expressão gênica de *HAMP* se correlacionou negativamente com a contagem plaquetária, especialmente se selecionados apenas os pacientes portadores de anemia falciforme, conforme mostra a Figura 34.



**Figura 34** - Correlação entre contagem plaquetária e expressão gênica de hepcidina em monócitos de pacientes portadores de anemia falciforme,  $p=0.0007$ ,  $r_s=-0.59$ .

## *Discussão*

---



## 5 DISCUSSÃO

---

As hemoglobinopatias têm se tornado foco de atenção na Saúde Pública brasileira, particularmente desde a virada do século XXI. Foram reconhecidas sua frequência relativamente alta na população brasileira, bem como sua complexidade clínica e importância do controle adequado de suas complicações. Essa nova perspectiva tem levado ao aumento do número de pacientes diagnosticados e maior precocidade do tratamento, principalmente após a instituição do Programa Nacional de Triagem Neonatal (PNTN) em 2001, pela portaria GM/MS 822/GM (Brasil, 2001). Na Fase II do PNTN, a detecção de hemoglobinas variantes foi incluída com o objetivo de detectar mais precocemente os portadores de hemoglobinopatias, com destaque para as doenças falciformes. De acordo com os dados do Ministério da Saúde, 14 das 27 Unidades da Federação já chegaram à Fase II, incluindo os Estados de São Paulo e Pernambuco, locais de origem dos pacientes selecionados no presente estudo ([http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id\\_area=1061](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area.cfm?id_area=1061)).

Com a melhora no diagnóstico dessas e de outras hemoglobinopatias, o conhecimento a respeito dos aspectos fisiopatológicos envolvidos no tratamento das complicações destas doenças cresce em importância a cada dia, e neste estudo, foi dada especial atenção aos distúrbios do metabolismo de ferro, uma vez que o excesso de ferro é via comum de morbidade em muitos desses pacientes (Ballas, 2001).

Estudos clássicos já haviam apontado a sobrecarga de ferro como a principal causa de morbimortalidade nos portadores de talassemia maior, cronicamente dependentes de transfusões desde a primeira infância. Se, por um lado, a descoberta da desferroxamina e a introdução da terapia quelante de ferro, a partir da década de 60 do século passado, resultou no aumento da sobrevivência desses pacientes, por outro, não houve grandes avanços na compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos na sobrecarga espontânea de ferro nos pacientes portadores de talassemia intermediária até quase 50 anos depois. As primeiras evidências sobre o mecanismo de absorção anormal de ferro nessas doenças foram publicadas a partir de 2000, com a descoberta da hepcidina e de seu papel fundamental na regulação do metabolismo do ferro (Park et al., 2001, Nicolas et al., 2001, Pigeon et al., 2001).

Dentre os reguladores conhecidos da produção de hepcidina, o GDF-15 é atualmente o principal mediador de efeito inibitório, e associou-se sua síntese à eritropoese ineficaz por eritroblastos imaturos em apoptose em síndromes talassêmicas raras, como as talassemias heterozigóticas E- $\beta$  e Hb Lepore/ $\beta$ , mais prevalentes no Sudeste Asiático e Mediterrâneo, respectivamente (Tanno et al., 2007). Na população brasileira, embora ocorram graus variáveis de miscigenação em razão da multiplicidade de etnias que a constituem, mutações talassêmicas  $\beta$  de origem mediterrânea são frequentes. A mutação mais frequente nos pacientes com TI é a IVS-I-6, o que justifica a validação da correlação entre altos níveis de GDF-15 e eritropoese ineficaz em nossa população. A talassemia  $\beta$  homozigótica IVS-I-6 também é conhecida como “talassemia portuguesa”, pela sua descrição tanto em Portugal, quanto em uma família brasileira de origem portuguesa (Tamagnini et al., 1983, Costa et al., 1991), e é encontrada particularmente com maior frequência em Pernambuco, região de origem dos pacientes estudados, onde provavelmente ocorreu um efeito fundador (Araújo et al., 2003, Bezerra, 2007). Ademais, a alta prevalência de doenças falciformes na mesma região, e no país como um todo, permitiu que fossem comparados dois tipos de hemoglobinopatia independentes de transfusão, sendo a talassemia  $\beta$  intermediária um modelo de eritropoese ineficaz crônica, contraposto à anemia falciforme, uma situação em que não ocorre ineficácia eritropoética, mas apenas um aumento da atividade eritropoética, compensatória da hemólise periférica crônica.

As dosagens de GDF-15 plasmático confirmaram que nossa população portadora de talassemia intermediária também exhibe altos níveis dessa citocina, como observado nos pacientes de outros genótipos, reforçando a associação entre alta produção de GDF-15 e eritropoese ineficaz.

Diante disso, avaliou-se a associação entre eritropoese ineficaz e GDF-15 em pacientes com anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12 (cobalamina), um modelo de eritropoese ineficaz adquirida e reversível com reposição do nutriente faltante.

Nesse estudo, os dados obtidos mostraram que a reversão da eritropoese ineficaz (confirmada pela recuperação dos níveis de hemoglobina e normalização dos altos índices de VCM) foi acompanhada de queda nos níveis de GDF-15. Assim, houve evidências de que não somente havia a coincidência da presença de eritropoese ineficaz e

alta produção de GDF-15, mas uma relação inversa – à medida em que a eritropoese se reestabelece, a produção de GDF-15 sofre concomitante redução. Esse dado reforça a associação entre eritropoese ineficaz e alta produção de GDF-15.

No entanto, embora menores, os níveis desse mediador encontrados nos pacientes com anemia falciforme também foram elevados, o que poderia sugerir a hipótese de que esse aumento de produção de GDF-15 pela medula óssea não seria exclusividade de eritroblastos em apoptose. Alternativamente, o aumento de GDF-15 observado nos pacientes com anemia falciforme poderia ser um sinal indireto de um possível componente de eritropoese ineficaz nessa doença. Assim, a hipótese a ser avaliada foi de que o aumento da produção endógena de GDF-15 não fosse exclusivo da hiperproliferação de eritroblastos em uma medula óssea com apoptose significativa dos precursores eritroides. Em uma tentativa de elucidar essa questão, pacientes com hemólise crônica por outras causas foram avaliados.

A quantidade de GDF-15 produzida em pacientes com hemólise por doenças de membrana e hemólise autoimune, entre outras, também se mostrou elevada, semelhante ao observado em pacientes com anemia falciforme, embora não nos mesmos níveis encontrados em talassemia ou anemia megaloblástica. Dessa forma, as evidências sugerem que a hemólise crônica de forma geral também se associa ao aumento da produção de GDF-15, ainda que, no caso das anemias hemolíticas com eritropoese ineficaz, maior produção dessa citocina provavelmente se deva à contribuição adicional da apoptose de eritroblastos na medula óssea.

GDF-15 é uma citocina contrarreguladora da expressão de hepcidina. Desse modo, esperar-se-ia uma deficiência sistêmica de hepcidina em todas as formas de anemias com altos níveis desse fator. Os níveis de hepcidina circulante apresentaram-se diminuídos nos pacientes com hemoglobinopatias, de forma condizente tanto com o aumento de GDF-15, quanto com as médias elevadas de ferritina sérica, se comparadas às dos controles. Entretanto, nos pacientes com carência de B12, em que os níveis de GDF-15 foram semelhantes aos observados nas talassemias, não se observou supressão da produção de hepcidina como esperado. Corroborando ainda mais uma produção fisiológica de hepcidina, não se constatou aumento dos níveis de ferritina sérica ou saturação de transferrina como

marcadores de sobrecarga de ferro em qualquer dos pacientes com anemia por deficiência de cobalamina ao diagnóstico. Assim, podemos deduzir que a hiperprodução de GDF-15 nos casos estudados não foi capaz de induzir aumento inapropriado da absorção de ferro no contexto da eritropoese ineficaz de causa carencial, diferentemente do observado em outras anemias em que esse processo patológico ocorre, tais como talassemias e anemias diseritropoéticas congênitas (Tanno et al., 2007, Finkenstedt et al., 2009, Casanovas et al., 2011). Há evidências em modelos animais de que a atividade eritropoética é essencial para a supressão da hepcidina, conforme demonstrado nos estudos por Pak et al., em que camundongos submetidos a supressão da eritropoese por uso do quimioterápico carboplatina, ou ainda animais tratados com anticorpo anti-eritropoetina foram incapazes de baixar os níveis de hepcidina sistêmicos induzidos por sangria (Pak et al., 2006). O mesmo também foi observado em um estudo utilizando irradiação corporal total, que impediu a resposta de supressão da hepcidina através de anemia hemolítica induzida por fenilidrazina ou administração de eritropoetina em camundongos (Vokurka et al., 2006).

Algumas razões que podem explicar essa disparidade no grupo de deficiência de B12 são: a casuística relativamente pequena, que poderia ter selecionado, ao acaso, pacientes que não apresentam sobrecarga de ferro; o encontro frequente de doenças que incorrem em dificuldade de absorção adequada de ferro nas populações com carência de vitamina B12, como, por exemplo, a presença de gastrite atrófica e infecção por *Helicobacter pylori*, o que poderia gerar uma incapacidade relativa do trato gastrointestinal de responder a um estímulo inadequado para o aumento da absorção de ferro (Wickramasinghe, 2006); e os antecedentes de transfusão esporádica dos pacientes com talassemia, que já geram um acréscimo no aporte total de ferro durante a vida desses pacientes, tornando a sobrecarga de ferro um evento mais precoce.

É interessante notar que, considerando o decréscimo dos níveis de GDF-15 logo após o início do tratamento dos pacientes com carência de cobalamina, esperava-se que houvesse aumento da produção de hepcidina, o que não se confirmou. Observou-se a redução dos níveis de hepcidina durante o tratamento, uma resposta adequada porque, com a reposição de vitamina B12 e reestabelecimento da eritropoese normal, haveria uma elevação do consumo de ferro pela medula óssea. Uma provável necessidade de incremento

na absorção desse metal justificaria, assim, uma queda na produção de hepcidina para permitir livre exportação do metal pela ferroportina, tanto pelos enterócitos duodenais, quanto por hepatócitos e células do sistema retículo-endotelial mobilizando estoques de ferro. Da mesma maneira, passado o período de recuperação com produção acelerada de eritrócitos, os níveis de hepcidina voltaram aos iniciais. Além disso, pacientes com hemólise de outras causas, mesmo com níveis aumentados de GDF-15, também apresentaram produção de hepcidina preservada, comparáveis às dos controles.

Desse ponto de vista, ainda que os níveis de GDF-15 tenham se correlacionado positivamente com a ferritina sérica e negativamente com os níveis de hemoglobina, em concordância com estudos prévios (Tanno et al., 2007, 2009), o GDF-15 não se caracterizou como citocina capaz de estabelecer de forma isolada e suficiente a relação entre as necessidades medulares de ferro e a captação ou mobilização sistêmica desse metal. Isso favorece outras hipóteses atuais sobre a existência de outros sinalizadores possivelmente desempenhando essa função, como, por exemplo, o recentemente descrito TWSG-1 (*twisted gastrulation homolog 1*) (Tanno et al., 2009). Foi descrito que essa molécula tem a capacidade de interferir com a transdução dos sinais estimulatórios da produção de hepcidina mediados por BMP2 e BMP4 em um modelo murino, e também está hiperexpressa em tecidos hepático, esplênico e de medula óssea de camundongos transgênicos talassêmicos. Entretanto, investigações sobre esse peptídeo ainda são escassas, pois não há relatos de como ocorre sua produção em humanos, nem métodos de quantificação disponíveis comercialmente até o momento.

Estudos prévios em pessoas deficientes de ferro após doação de sangue mostraram que não há diferença na produção de GDF-15 em comparação com pessoas saudáveis (Tanno et al., 2010). Desse modo, é razoável supor que a redução da hemoglobinizacão no interior da medula seria insuficiente para modular a produção de GDF-15, enquanto qualquer estímulo de expansão do compartimento eritroide, como é o caso da hemólise crônica, de forma geral, é capaz de estimular a produção dessa citocina e sinalizar a necessidade de um maior aporte de ferro pelo organismo, suprimindo as necessidades de produção de novos eritrócitos. Os dados apresentados neste estudo, mostrando aumento de GDF-15 nas hemoglobinopatias, com ou sem eritropoese ineficaz,

corroboram o entendimento do papel do GDF-15 como sinal gerado pela medula óssea como forma de informar à distância a necessidade corporal de ferro, ainda que haja evidências de que ele não seja o único, nem necessariamente o principal supressor da produção de hepcidina nesta relação entre eritropoese e metabolismo do ferro.

Ainda não são claros todos os mecanismos que podem interferir nessa relação, de forma a explicar por que a supressão da hepcidina foi observada nas hemoglobinopatias, e não na hemólise crônica por outras causas ou na deficiência de cobalamina. Porém, um fator provavelmente importante poderia ser o grau de anemia – em nossa casuística, os níveis de hemoglobina médios nas hemoglobinopatias foi inferior à média de hemoglobina dos pacientes com outros tipos de hemólise. Nesse segundo grupo, seis pacientes estudados apresentavam apenas hemólise compensada, sem anemia, mas ainda assim, seus níveis de GDF-15 e hepcidina plasmáticos foram semelhantes aos dos demais pacientes do mesmo grupo. Considerando-se que a anemia e a hipóxia tecidual resultante são fundamentais na regulação da hepcidina, essa diferença pode ser parcialmente responsável pela presença de níveis díspares de hepcidina em grupos com níveis semelhantes de produção de GDF-15. É evidente que a variação no grau de anemia não explica a queda dos níveis de hepcidina na primeira semana de tratamento dos pacientes com anemia por deficiência de B12, uma vez que não houve aumento significativo dos níveis de hemoglobina nesse curto período de tempo.

Esses resultados também corroboram os conceitos atuais de que há uma relativa predominância dos estímulos a favor da absorção de ferro, como o aumento da atividade eritropoética e a hipóxia tecidual gerada pela anemia, sobre a percepção dos estoques totais de ferro corporal. Esse desequilíbrio relativo provavelmente advém de uma seleção natural ao longo de milhões de anos na natureza, em que o ferro é um elemento escasso e que deve ser preservado pelos organismos para a manutenção de funções fundamentais à sobrevivência de qualquer espécie, tais como a respiração celular e transporte de gases. A hepcidina já foi descrita em outras espécies animais, tais como ovinos e peixes (Park et al., 2001, Shike et al., 2004, Badial et. al, 2011). Em futuros estudos dos mecanismos de regulação do metabolismo do ferro, provavelmente serão encontradas vias de sinalização semelhantes em diversos seres vivos superiores, desde que os processos biológicos

envolvidos na produção do sangue e oferta de oxigênio tecidual sejam semelhantes. Portanto, muitos modelos animais poderão ser utilizados para elucidar por que prevalece a ação da atividade eritropoética por meio de citocinas como o GDF-15 na presença de hipóxia tecidual significativa, levando a sobrecarga de ferro espontânea.

Tanto os níveis de pro-hepcidina quanto de hepcidina plasmática apresentaram-se reduzidos nos diferentes grupos de pacientes portadores de hemoglobinopatias em comparação com o que encontramos nas amostras de controles saudáveis. Embora isso tenha sugerido uma proporcionalidade entre as formas precursora e madura, não se detectou correlação entre essas medidas, denotando a possibilidade de que a clivagem por furina, que transforma a molécula de pro-hepcidina em hepcidina-25, não ocorra de forma constante e previsível, constituindo um ponto importante de regulação pós-traducional a ser estudado no futuro.

Além disso, apenas a hepcidina-25 se correlacionou com os níveis de IL-6, e não houve correlação direta dos níveis de GDF-15 encontrados com a produção de pro-hepcidina ou hepcidina-25. Isso sugere que a IL-6 tenha um efeito tanto estimulador da transcrição gênica, como possivelmente um efeito pós-traducional, e não podemos atribuir ao fator eritropoético a regulação exclusiva da produção da molécula precursora da hepcidina.

A análise dos pacientes com anemia falciforme em função do histórico transfusional também permitiu algumas considerações sobre a relação entre IL-6 e hepcidina. Além da avaliação dos níveis de ferritina sérica, um critério habitualmente utilizado nos protocolos internacionais de quelação de ferro define que pacientes com 10 a 20 episódios transfusionais já são elegíveis para terapia quelante de ferro (Araújo, 2009; Brittenham, 2011). Em função dos relatos de menos complicações extra-hepáticas em pacientes com anemia falciforme do que em portadores de talassemia (Fung et al., 2006, Vichinsky et al., 2005, Walter et al., 2006), optou-se por utilizar a contagem de vinte concentrados de hemácias como limite de corte populacional. Essa distinção teve, de fato, capacidade de discriminar uma população (acima de 20 CH prévios, grupo SS-T) em que a saturação de transferrina já estava elevada, mesmo que os níveis de ferritina sérica não estivessem ainda significativamente diferentes.

Há muitas controvérsias na literatura científica quanto à melhor forma de se identificar pacientes com anemia falciforme com sobrecarga de ferro relevante sem o uso de exames de alta complexidade, tais como a ressonância nuclear magnética para avaliação do conteúdo de ferro hepático e cardíaco. O uso da ferritina sérica tem suas limitações pelo fato de estímulos inflamatórios crônicos poderem induzir sua produção como proteína de fase aguda. Desse modo, o histórico transfusional tem sido defendido como bom preditor de sobrecarga exógena de ferro (Adamkiewicz et al., 2009), embora haja argumentos favorecendo uma abordagem levando em consideração a intensidade média de carga transfusional, como a “taxa transfusional” descrita por Inati et al. (2009).

Apesar do atual entendimento de que pacientes com doenças falciformes apresentam um estado inflamatório crônico, as medidas de PCR permitem sugerir que não houve diferenças na atividade inflamatória de uma forma global, nem diferenças na produção de hepcidina relacionada ao histórico transfusional. Porém, a produção de IL-6 foi significativamente maior nos pacientes com anemia falciforme, destacando-se que o grupo com maior histórico de transfusões (SS-T) apresentou níveis maiores de IL-6, bem como maior saturação de transferrina. Deve-se levar em consideração que pacientes relativamente mais graves podem ter sido selecionados no grupo SS-T. Indivíduos com antecedente de politransusão possivelmente estiveram mais sujeitos a complicações que levaram à necessidade transfusional durante a vida por conta de um grau mais elevado de inflamação crônica, aqui caracterizado por uma maior produção de IL-6. Ademais, os valores aumentados de saturação de transferrina no grupo SS-T antecedem a presença de um alto risco desse grupo de evoluir com sobrecarga de ferro por conta da quantidade cumulativa recebida de ferro de origem transfusional. Com os dados obtidos, podemos reforçar a hipótese de que o conhecimento dos antecedentes transfusionais pode ser uma ferramenta simples e útil para triagem de pacientes com potencial risco de evolução para sobrecarga de ferro, mesmo na ausência da indicação de programa de transfusão regular. O estudo de Porter e Huehns já havia identificado uma correlação entre o histórico transfusional e níveis de saturação de transferrina e de ferritina, e havia observado que pacientes submetidos a transfusão de troca apresentavam menores índices de sobrecarga de ferro corporal do que os que receberam transfusão simples (Porter e Huehns, 1987).

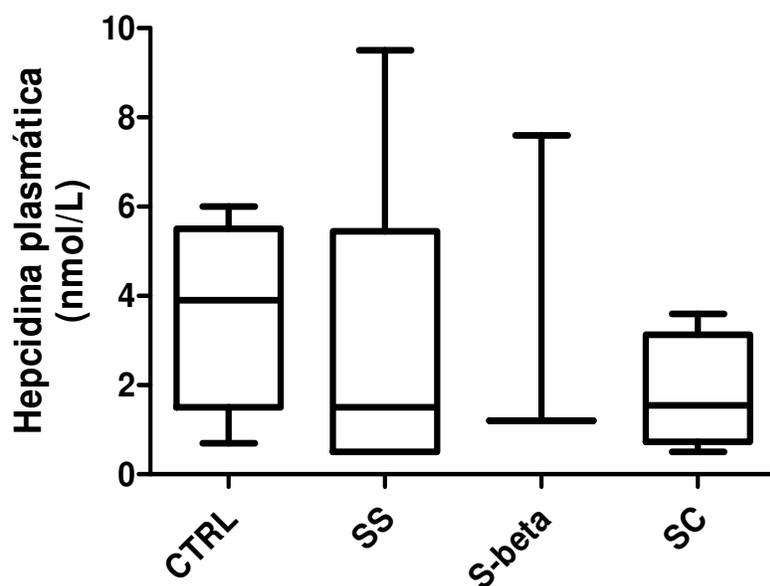
Estudos prospectivos podem ser planejados para avaliar se pacientes com um perfil “politransfusional” apresentam, em seu estado basal, uma atividade inflamatória maior, e se esse grupo de pacientes tende a evoluir no futuro com quadros clínicos de maior gravidade que indiquem o uso de hidroxiureia e/ou de quelação de ferro.

Ainda em relação aos pacientes com anemia falciforme, a correlação negativa entre os níveis de desidrogenase láctica (LDH) e hepcidina circulante ilustra novamente a importância da comunicação entre medula óssea e biodisponibilidade de ferro corporal. Como o nível de hemólise mantém uma certa proporcionalidade com as dosagens de LDH, quanto mais intenso o processo hemolítico, menor o nível de hemoglobina, levando a um maior aumento da atividade eritropoética. Isso eleva os níveis de GDF-15, podendo reduzir a produção de hepcidina e aumentar a absorção de ferro sistêmica. Outro aspecto mais complexo dessa relação entre LDH e hepcidina envolve o papel do ferro na patogênese das complicações da anemia falciforme. Considera-se a hipótese de que os níveis de LDH poderiam ter valor prognóstico nas doenças falciformes, e há uma tendência a se associar quadros clínicos hiper-hemolíticos da anemia falciforme com determinados fenômenos como hipertensão pulmonar, priapismo e úlceras de membro inferior (Kato et al., 2006). Pode-se aventar a possibilidade de que o ferro participe na fisiopatologia de alguma dessas complicações, uma vez que a redução da hepcidina está associada a hemólise, e com o consequente incremento na absorção de ferro. Variações no nível de ferro afetam a produção de HIF-1 (*hypoxia inducible factor 1*), um regulador da produção de proteínas como o VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), envolvido na angiogênese (Linden et al., 2003), e alterações do HIF-1 afetam a produção de outros mediadores como PIGF (*placental growth factor*) e endotelina-1, relacionados à fisiopatogênese da hipertensão pulmonar e de úlcera crônicas de pele (Patel et al., 2008; Botusan et al., 2008). Além disso, polimorfismos em genes envolvidos na via de sinalização BMP/SMAD, que regula o gene *HAMP*, tais como *BMPR2* e *BMP6*, já foram associados a maior ocorrência de hipertensão pulmonar em pacientes com anemia falciforme (Ashley-Koch et al., 2008). Dessa forma, a desregulação da produção da hepcidina nas hemoglobinopatias estaria potencialmente associada a mais do que simplesmente à sobrecarga de ferro, mas também a um efeito pleotrópico sobre o complexo espectro de complicações da falcização. Portanto, o

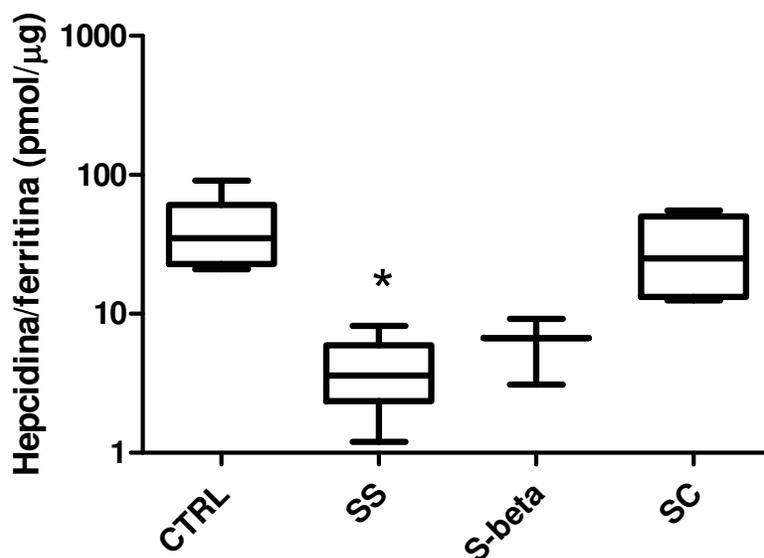
controle adequado do ferro poderia constituir uma nova estratégia de abordagem terapêutica nas doenças falciformes, através do manejo, por exemplo, com o uso de quelantes de ferro ou de agonistas e antagonistas de hepcidina.

Apesar de sua importância, há uma relativa pobreza de dados na literatura científica até o momento sobre a produção de hepcidina em hemoglobinopatias. O maior estudo até o momento nesta área foi publicado por Kroot et al. em 2009. Foram avaliados os níveis de hepcidina em um grupo heterogêneo de doenças falciformes, contando com apenas 16 pacientes, sendo 9 com anemia falciforme, 3 com S- $\beta$ -talassemia e 4 portadores de hemoglobinopatia SC. Diferentemente do estudo atual, nessa publicação, não se encontrou qualquer diferença estatística entre a produção de hepcidina em controles e pacientes, possivelmente devido ao pequeno número de pacientes. Porém, a análise dos dados mostrou que a razão hepcidina/ferritina estava alterada, em especial nos pacientes homocigotos para hemoglobina S. A razão hepcidina/ferritina é um índice previamente utilizado por vários autores como forma de corrigir os valores obtidos de hepcidina dosados em função do grau de sobrecarga corporal de ferro, representado no denominador pelos valores de ferritina sérica (Nemeth et al., 2003; Nemeth et al., 2005, Kearney et al., 2007, Piperno et al, 2008, van Dijk et al., 2008).

Nas Figura 35 e 36, estão representados dois gráficos desenhados a partir dos dados brutos publicados na tabela do referido artigo, destacando que, embora não tenha havido diferença nos valores absolutos de hepcidina plasmática, houve redução na razão hepcidina/ferritina, principalmente nos pacientes homocigotos SS e heterocigotos duplos S- $\beta$ .



**Figura 35** - Dosagem de hepcidina plasmática em pacientes com anemia falciforme (SS), S- $\beta$ -talassemia (S-beta) e hemoglobinopatia SC, em comparação com controles portadores de traço falciforme ou traço de hemoglobina C (CTRL),  $p > 0.05$ . Desenhado a partir de Kroot et al., 2009.



**Figura 36** - Razão hepcidina/ferritina plasmática em pacientes com anemia falciforme (SS), S- $\beta$ -talassemia (S-beta) e hemoglobinopatia SC, em comparação com controles portadores de traço falciforme ou traço de hemoglobina C (CTRL),  $*p = 0.0006$ . Desenhado a partir de Kroot et al., 2009.

Houve concordância evidente dos dados obtidos no estudo atual (vide Figuras 22 e 23, nas páginas 96 e 97, respectivamente) com os dados de Kroot et al., demonstrando uma deficiência relativa de hepcidina em relação à carga corporal de ferro nos pacientes com anemia falciforme.

Foi observado também que, como esperado, a deficiência de hepcidina é ainda mais marcante nos pacientes com talassemia  $\beta$  intermediária, uma demonstração mais clara das diferenças no potencial supressor do GDF-15 proporcional aos níveis sistêmicos encontrados, muito maiores na talassemia, acarretando aumento da absorção de ferro e sobrecarga por esse metal nesses pacientes. Em contrapartida, a razão hepcidina/ferritina está conservada nos pacientes diagnosticados com anemia megaloblástica por deficiência de vitamina B12, em níveis praticamente indistinguíveis dos encontrados em controles saudáveis, sugerindo que o aumento na produção de GDF-15, embora capaz de suprimir a hepcidina, parece insuficiente para controlar isoladamente essa produção nos pacientes sem hemoglobinopatia, e favorece o papel de mediadores alternativos produzidos pela medula óssea nessa situação.

O histórico transfusional e o uso de hidroxiureia, embora interfiram com a sobrecarga corporal de ferro e com a atividade eritropoética, respectivamente, não interferiram com a produção de hepcidina na anemia falciforme, que permaneceu relativamente baixa em todos os subgrupos nessa análise, ainda que a síntese nos pacientes com talassemia seja invariavelmente a menor dentre os grupos analisados.

É interessante observar que, embora a pro-hepcidina não tenha mostrado correlação em nenhuma análise com os marcadores de ferro corporal, as medidas da razão pro-hepcidina/ferritina também foram capazes de demonstrar uma relativa deficiência de pro-hepcidina frente ao estoque corporal de ferro, inclusive mantendo a diferença entre TI e anemia falciforme.

Portanto, mesmo que a ferritina não seja um marcador ideal do estoque corporal de ferro, é possível avaliar a regulação da absorção de ferro corrigindo-se os níveis de hepcidina, e até certo ponto, mesmo os de pro-hepcidina, em função da ferritina sérica. Nossos dados sugerem que a razão hepcidina/ferritina pode ser um melhor indicador da

deficiência relativa de hepcidina de causa eritropoética do que a medida simples dos níveis de hepcidina circulante.

Variações no grau de deficiência de hepcidina em relação ao ferro corporal total podem ser a explicação para a diferença observada clinicamente entre os padrões de sobrecarga de ferro em pacientes com anemia falciforme e pacientes talassêmicos em regime de transfusão regular. De forma geral, o segundo grupo tende a evoluir mais rapidamente com sobrecarga de ferro, inclusive com deposição desse metal especialmente mais grave em órgãos como coração e glândulas endócrinas (Fung et al., 2006, Vichinsky et al., 2005, Walter et al., 2006). Estudos prévios já consideraram a questão do aporte transfusional de ferro diferente, uma vez que a talassemia é, geralmente, tratada com esquema de hipertransfusão simples, enquanto se prefere a transfusão de troca na anemia falciforme. Além disso, são utilizados alvos de nível de hemoglobina distintos em cada doença, resultando em uma quantidade efetivamente menor de ferro administrado nos casos de doença falciforme (Araújo, 2007). Entretanto, pacientes com aporte de ferro transfusional semelhante apresentam padrões distintos de acometimento do organismo pelo excesso desse metal e, possivelmente, o estado inflamatório crônico, aqui nesse estudo avaliado pelos níveis de IL-6, por exemplo, pode contribuir com um maior estímulo à produção de hepcidina e uma relativa proteção dos sítios extra-hepáticos contra o acúmulo de ferro. Os motivos que levam o microambiente hepático a ser sacrificado em prol dos demais órgãos ainda necessitam ser estudados, e podem estar relacionados a uma complexa interação entre hepatócitos e células de Kupffer, os representantes hepáticos do sistema retículo-endotelial (Theurl M et al., 2008).

Em contraste com essa hipótese, um estudo recente sugere que níveis reduzidos de hepcidina levam a um estado pró-inflamatório em um modelo murino (Pagani et al., 2011). A queda dos níveis de hepcidina causada por carência de ferro tornou os animais capazes de produzir quantidades maiores de IL-6 e TNF- $\alpha$  frente a um estímulo inflamatório por LPS. Assim, pode haver um mecanismo endógeno de regulação da produção de hepcidina nas hemoglobinopatias envolvendo IL-6, de modo que a falta de hepcidina levaria à produção de IL-6 como uma espécie de retroalimentação (“feedback”). Ademais, isso poderia explicar, indiretamente, por que infecções adquiridas na comunidade

em pacientes com talassemia ou anemia falciforme apresentam maior gravidade do que em pacientes sem hemoglobinopatia.

Também de modo alternativo a estudos prévios, que estudaram predominantemente a produção de hepcidina no hepatócito, este estudo visou caracterizar melhor a produção monocítica de hepcidina.

Em concordância com estudos em modelos animais, bem como com as publicações de Theurl et al., encontramos expressão gênica de hepcidina em monócitos do sangue periférico de controles e pacientes (Theurl I et al., 2008). Nossas observações mostraram que essa produção é acentuadamente maior em portadores de anemia falciforme, especialmente naqueles em uso de hidroxiureia.

Por um lado, seria esperado que pacientes com talassemia intermediária, com altos níveis de GDF-15, apresentassem níveis de hepcidina reduzidos em relação a pacientes com anemia falciforme, pois a supressão da produção da hepcidina seria teoricamente muito menor nas doenças falciformes, quer sistemicamente, no nível do hepatócito, quer no nível do monócito. Todavia, seria lógico que os níveis de hepcidina monocítica fossem inferiores aos dos controles, fato que não se confirmou nos dados obtidos. Esse fato poderia ocorrer devido a duas possibilidades: o efeito supressor do GDF-15 pode não ser tão intenso nos monócitos circulantes quanto nos hepatócitos, uma possível diferença na sensibilidade celular ao GDF-15 que poderia ser explicada por diferença de receptores da citocina, por exemplo; ou a hepcidina monocítica pode não necessitar de supressão do ponto de vista fisiológico da mesma forma que a hepática, por ser produzida em menor quantidade, e ainda por apresentar função possivelmente diferente, no nível celular da microvasculatura, não direcionada à regulação dos níveis de ferro.

Até o momento, não se caracterizou ainda o exato receptor dessa citocina, tornando difícil a caracterização de diferenças na suscetibilidade celular a seu efeito. A possibilidade de a hepcidina desempenhar algum tipo de função imune no monócito circulante é amparada por vários estudos em modelos animais, segundo os quais a hepcidina tem, por princípio, uma função antimicrobiana desde a sua primeira descrição (de onde foi cunhado o nome “hep-cidina”, molécula com função antibiótica de origem hepática). Tal fato foi bem demonstrado em macrófagos alveolares e esplênicos murinos

(Liu et al., 2005, Nguyen et al., 2006). Da mesma forma, pelas funções imunes do monócito, podemos supor que a produção de hepcidina seja regulada de forma diversa do fígado, com menor influência do GDF-15, com um papel em potencial na resposta imune.

Não foram observadas quaisquer correlações entre níveis de ferritina sérica, saturação de transferrina e expressão de hepcidina monocítica que apoiassem uma função ferro-regulatória desse tipo de produção de hepcidina. Apesar de a ferritina ser uma proteína de fase aguda (Northrop-Clewes CA, 2008), a ausência de correlação com as medidas de proteína C reativa sugere que havia realmente sobrecarga de ferro em muitos pacientes, ainda que fora de um programa regular de transfusão. Nos pacientes com anemia falciforme, a presença de um estado inflamatório crônico não pareceu influenciar os níveis de expressão de hepcidina em monócitos.

A distinção entre pacientes mais ou menos transfundidos também não evidenciou subgrupos com maior ou menor nível de hepcidina monocítica, demonstrando que, apesar de o histórico transfusional ser um razoável preditor de sobrecarga de ferro exógena, o acúmulo corporal desse ferro não influenciou os níveis de expressão de hepcidina encontrados nos monócitos circulantes.

Nos estudos de correlação da expressão gênica de *HAMP* em monócitos, demonstrou-se uma correlação interessante entre essa expressão e as contagens de plaquetas circulantes. Por um lado, sabe-se que tanto a produção de hepcidina quanto o processo de megacariopoese são estimulados por IL-6, de modo que uma correlação positiva entre as medidas de *HAMP* e plaquetas seria condizente com uma resposta ao estado inflamatório crônico da anemia falciforme. As plaquetas também estão envolvidas no processo vaso-oclusivo das doenças falciformes, como já descrito pela presença de agregados monócito-plaqueta nesses pacientes (Wun et al., 2002). Outro estudo demonstrou a presença de até 70% de agregados multicelulares (isto é, monócito-reticulócito-plaqueta) e que a adesão de plaqueta seria capaz de ativar o monócito (Brittain et al., 2008). Por outro lado, a correlação encontrada neste estudo foi negativa, o inverso do esperado nesse microambiente inflamatório. Apesar do alto nível de significância estatística, não se pode descartar a possibilidade de se tratar de uma correlação espúria. Uma outra explicação seria que a ativação da população de monócitos circulantes pelas plaquetas ocorra por uma via

alternativa, cujo efeito resulta na redução da expressão de hepcidina, e não em sua elevação, como seria esperado pelo efeito isolado da IL-6 circulante.

Em relação às vias intracelulares de sinalização e regulação da expressão de hepcidina, não se confirmaram alterações nas expressões gênicas de *TLR4*, *SMAD4* ou *STAT3*. Todavia, Huang et al. haviam demonstrado em animais que o estímulo eritropoético mediado por eritropoetina era capaz de reduzir a transcrição de *HAMP*. Uma possível explicação seria a insensibilidade do monócito a eritropoetina, de modo que a regulação dessas vias seria influenciada por outras citocinas neste tipo celular. Além disso, diferenças qualitativas, tais como grau de fosforilação de *STAT3*, por exemplo, não avaliadas neste estudo, também podem estar presentes sem que se modifique o ritmo de transcrição gênico.

Diante da ausência de evidências da relação da expressão do gene *HAMP* em monócitos com a biodisponibilidade corporal de ferro, o achado de superexpressão relativa do gene *HAMP* com o uso de hidroxiureia levou à investigação de um possível efeito direto do fármaco sobre as células estudadas.

Como não dispúnhamos de amostras pareadas de pacientes antes e depois do tratamento com HU, optamos pela abordagem através de um modelo *in vitro* com a utilização de células de linhagem monocítica THP-1. Essa linhagem imortalizada leucêmica é um modelo adequado para estudo, pois já se demonstrou sua expressão de hepcidina, bem como a regulação gênica mediada por ferro em interação com regiões de elementos responsivos a ferro (IREs – *iron responsive elements*) (Weiss et al., 1996).

Os experimentos permitiram observar que o uso de hidroxiureia nas concentrações utilizadas não foi tóxico para as células, e que havia aumento da expressão do gene *HAMP* com o tratamento com HU. Evidentemente, esse modelo tem diversas limitações: a principal é o fato de se tratar de uma célula leucêmica imortalizada que não tem o papel fisiológico de um monócito normal, uma vez que o monócito não se replica espontaneamente na circulação. Também não há interação celular, situação a que o monócito fica constantemente exposto no organismo humano, seja interagindo com outras células sanguíneas, seja com o endotélio vascular; neste experimento, não há exposição às citocinas circulantes, em particular aos mediadores pró-inflamatórios, em sua maioria aumentados em pacientes com anemia falciforme (Lanaro et al., 2009). Por fim, trata-se de

um tratamento único e agudo, diferente do tratamento crônico ao qual os pacientes que foram selecionados estão submetidos. Foram usadas concentrações de HU que não necessariamente correspondem à biodisponibilidade real da hidroxiureia no interior dos vasos sanguíneos no momento da coleta das amostras. Ainda assim, obteve-se uma prova conceitual da capacidade da hidroxiureia de induzir a transcrição do gene da hepcidina, fato não previamente descrito na literatura, caracterizando-a como um fármaco potencialmente utilizável como agonista da hepcidina monocítica em estudos futuros.

A expressão de ferroportina nos monócitos foi avaliada com grande interesse, pois essa proteína é o único exportador de ferro descrito em humanos. Em vista dos níveis baixos de hepcidina circulante nos pacientes portadores de hemoglobinopatias, esperava-se que a expressão gênica de ferroportina nos monócitos desses pacientes estivesse aumentada, ou pelo menos, preservada em comparação com as células dos indivíduos controles, o que não se confirmou. Como não houve associação de baixa expressão de ferroportina com níveis elevados de hepcidina sérica, pode-se especular que o aumento da expressão gênica de hepcidina nos próprios monócitos na anemia falciforme possam refletir um incremento da biodisponibilidade de hepcidina no microambiente, suprimindo e degradando a ferroportina dos monócitos, de uma forma autócrina, como já proposto anteriormente por Theurl I et al. (2008). Alternativamente, poderíamos considerar que as elevadas quantidades de ferro circulante nos pacientes com talassemia possam ter um efeito supressor direto sobre os monócitos nessa doença, sinalizando a ausência da necessidade de se exportar ferro e justificando a baixa expressão de ferroportina nesses casos.

Em relação à expressão das cadeias leve e pesada da ferritina em monócitos, notou-se que os pacientes com os maiores níveis de ferritina sérica (grupo com talassemia) não apresentaram elevação significativa da expressão dos genes *FTL* ou *FTH*, embora estudos em camundongos tenham demonstrado que a ferritina sérica nesse modelo animal se origina de macrófagos (Cohen et al., 2010). É possível que esse mecanismo não seja idêntico em humanos, pois há diferenças entre as proporções das cadeias entre as duas espécies: a ferritina murina é composta majoritariamente por cadeia L de ferritina, diferentemente da humana.

As cadeias que compõem a ferritina parecem apresentar funções distintas na regulação do ferro, apesar de apresentarem 97% de homologia entre si (Dörner et al., 1985), e de ambas se elevarem em expressão na diferenciação de monócito para macrófago (Marziali et al., 1997). A cadeia L seria responsável pelo acúmulo de ferro a longo prazo, enquanto a cadeia H regularia a biodisponibilidade mais imediata de ferro e, possivelmente, se relacionaria ao controle do estresse oxidativo (Zhang et al., 2009). Koorts et al. recentemente descreveram que estímulos inflamatórios crônicos poderiam ser responsáveis pelo aumento da cadeia H em macrófagos medulares (2011). Entretanto, não encontramos diferenças significativas entre as proporções de cadeias H e L nos monócitos dos pacientes com anemia falciforme, em que comprovadamente há um estado inflamatório.

Foi demonstrado um aumento significativo da expressão de ambos os genes *FTH* e *FTL* apenas nos pacientes em uso de HU, sem alteração concomitante dos níveis do exportador de ferro, a ferroportina. Esses dados sugerem que a hiperexpressão das cadeias de ferritina talvez não esteja relacionada à retenção de ferro intracelular por falta de ferroportina. Por outro lado, a avaliação da expressão gênica possivelmente é insuficiente para se tirar uma conclusão definitiva, pois esse método não é capaz de determinar se, mantendo níveis estáveis de expressão gênica, a ferroportina poderia estar internalizada por efeito do tratamento da HU, restringindo a exportação celular de ferro e levando a sua retenção no interior dos monócitos na forma de ferritina.

Há relato de que o uso de HU eleva os níveis de ferritina no nível celular em diversas linhagens celulares tumorais (McClarty et al., 1990). A HU é um inibidor da ribonucleotídeo redutase, e seu efeito se faz através da retirada de um radical tirosil da subunidade M2 da enzima, que também contém dois íons férricos acoplados em seu centro, que são liberados com a inativação dessa subunidade. Assim, caracterizou-se que um dos efeitos da HU é de elevar a transcrição dos genes das cadeias da ferritina, e a hiperprodução, principalmente da cadeia H, está associada a seu efeito e a mecanismos de resistência tumoral a esse quimioterápico (McClarty et al., 1990). O mesmo trabalho explica detalhadamente o fato de que o aumento da ferritina intracelular não se faz necessariamente por aumento da expressão gênica, mas também pode ocorrer em nível pós-traducional por aumento da meia-vida das cadeias já produzidas. Todavia, o uso crônico de

HU poderia explicar as expressões gênicas aumentadas de *FTL* e *FTH* nos monócitos do grupo de pacientes com anemia falciforme tratados.

Tomados em conjunto, os dados deste estudo representam a primeira avaliação da produção da hepcidina e de seus fatores moduladores nas hemoglobinopatias, tanto do ponto de vista sistêmico quanto celular, demonstrando a importância do conhecimento não apenas sobre a regulação do metabolismo do ferro nas doenças humanas que podem necessitar de transfusão sanguínea, mas também sobre a comunicação entre a eritropoese e as necessidades corporais de ferro, e do potencial para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas nessas doenças.



*Conclusões*

---



## 6 CONCLUSÕES

---

- Trata-se do primeiro estudo que associa o aumento na produção de GDF15 tanto à presença de eritropoese ineficaz de causa hereditária (talassemia  $\beta$  intermediária homocigota IVS-I-6) e adquirida (anemia por carência de cobalamina), quanto aos aumentos da atividade eritropoética por hemólise crônica de diversas causas (anemia falciforme, esferocitose hereditária, anemia hemolítica autoimune etc.);

- Observou-se que a produção de hepcidina não está suprimida em todos os estados patológicos em que a síntese de GDF-15 se eleva. A supressão ocorre em particular nas hemoglobinopatias;

- A razão hepcidina/ferritina pode ser um melhor indicador da deficiência relativa de hepcidina causada pelo aumento de atividade eritropoética. O aumento relativo na produção de hepcidina na anemia falciforme poderia estar relacionado a níveis mais altos de IL-6 em função do estado inflamatório crônico na presença do processo vaso-oclusivo;

- Trata-se da primeira descrição da expressão de hepcidina monocítica na anemia falciforme e talassemia  $\beta$  intermediária, e confirma observações anteriores que não associaram a hepcidina em células do sistema fagocítico-mononuclear com funções ligadas ao controle do ferro corporal;

- A hepcidina monocítica na anemia falciforme poderia estar relacionada também a interações celulares importantes no processo vaso-oclusivo, tais como, por exemplo, a interação de monócitos e plaquetas;

- O tratamento com hidroxiureia em pacientes com anemia falciforme se associou ao aumento da expressão de ferritina monocítica, e estudos *in vitro* confirmaram a observação relacionada a hiperexpressão de hepcidina em monócitos nessa população de pacientes, destacando a possível utilidade terapêutica da hidroxiureia como agonista de hepcidina monocítica.



## *Referências Bibliográficas*



## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Adamkiewicz TV, Abboud MR, Paley C, Olivieri N, Kirby-Allen M, Vichinsky E, Casella JF, Alvarez OA, Barredo JC, Lee MT, Iyer RV, Kutlar A, McKie KM, McKie V, Odo N, Gee B, Kwiatkowski JL, Woods GM, Coates T, Wang W, Adams RJ. Serum ferritin level changes in children with sickle cell disease on chronic blood transfusion are nonlinear and are associated with iron load and liver injury. *Blood*. 2009 Nov 19;114(21):4632-8.

Agostinho MF, Arruda VR, Basseres DS, Bordin S, Soares MC, Menezes RC, Costa FF, Saad ST. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. *Blood Cells Mol Dis*. 1999 Oct-Dec;25(5-6):324-7.

Andrews NC. Disorders of iron metabolism. *N Engl J Med*. 1999; 341:1986-1995.

Araújo AS, Silva WA, Leão SA, Bandeira FC, Petrou M, Modell B, Zago MA. A different molecular pattern of beta-thalassemia mutations in northeast Brazil. *Hemoglobin*. 2003 Nov;27(4):211-7.

Araújo AS. Protocolos de transfusão em hemoglobinopatias. In: Hemoterapia – Fundamentos e Prática. Bordin JO, Langhi Junior DM, Covas DT (Eds.), São Paulo, Atheneu, 2007.

Araújo A, Drelichman G, Cançado RD, Watman N, Magalhães SM, Duhalde M Marfil J, Feliú A, Clementina L, Linares Ballesteros A, Di Stefano M; Latin American Experts Panel. Management of transfusional iron overload in Latin America: current outlook and expert panel recommendations. *Hematology*. 2009 Feb;14(1):22-32.

Ashley-Koch AE, Elliott L, Kail ME, De Castro LM, Jonassaint J, Jackson TL Price J, Ataga KI, Levesque MC, Weinberg JB, Orringer EP, Collins A, Vance JM, Telen MJ. Identification of genetic polymorphisms associated with risk for pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Blood*. 2008 Jun 15;111(12):5721-6.

Babitt JL, Huang FW, Wrighting DM, Xia Y, Sidis Y, Samad TA, Campagna JA, Chung RT, Schneyer AL, Woolf CJ, Andrews NC, Lin HY. Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression. *Nat Genet.* 2006; 38:531-539.

Badial PR, Oliveira Filho JP, Cunha PH, Cagnini DQ, Araújo JP Jr, Winand NJ, Borges AS. Identification, characterization and expression analysis of hepcidin gene in sheep. *Res Vet Sci.* 2011 Jun;90(3):443-50

Ballas SK. Iron overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Semin Hematol.* 2001 Jan;38(1 Suppl 1):30-6.

Barbosa KV, de Souza AF, Chebli JM, Proietti FA, Meirelles RS, de Souza JL. Hereditary hemochromatosis: population screening based on phenotype in Brazilian blood donors. *J Clin Gastroenterol.* 2005 May-Jun;39(5):430-4.

Bezerra MAC. Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares das síndromes talassêmicas em população do Estado de Pernambuco [Dissertação]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas, 2007.

Bittencourt PL, Palácios SA, Couto CA, Cançado EL, Carrilho FJ, Laudanna AA Kalil J, Gayotto LC, Goldberg AC. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis.. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Mar;35(3):329-35.

Bondi A, Valentino P, Daraio F, Porporato P, Gramaglia E, Carturan S, Gottardi E, Camaschella C, Roetto A. Hepatic expression of hemochromatosis genes in two mouse strains after phlebotomy and iron overload. *Haematologica.* 2005; 90:1161–1167.

Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, Catrina AI, Grünler J, Lindberg S, Pereira T, Ylä-Herttuala S, Poellinger L, Brismar K, Catrina SB. Stabilization of HIF-1alpha is critical to

improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Dec 9;105(49):19426-31.

Brittain JE, Knoll CM, Ataga KI, Orringer EP, Parise LV. Fibronectin bridges monocytes and reticulocytes via integrin alpha4beta1. *Br J Haematol*. 2008 Jun;141(6):872-81.

Brasil. Portaria GM/MS n.º 822/GM, de 06 de junho de 2001. Criação do Programa Nacional de Triagem Neonatal.

Brittenham GM. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *N Engl J Med*. 2011;364:146-56.

Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of hemochromatosis and related disorders. *Blood*. 2005;106:3710-7.

Camaschella C; Silvestri L. New and old players in the hepcidin pathway. *Haematologica*. 2008; 93(10):1441-1444.

Camaschella C. Diagnosis and treatment of non-HFE haemochromatosis. In: Beaumont C, Beris P, Beuzard Y, Brugnara C, editors. *ESH Handbook Disorders of Erythropoiesis, Erythrocytes and Iron Metabolism*, Genoa: Forum Service Editore; 2009. p.571-583.

Cançado RD, Chiattoni CS. Anemia de doença crônica. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2002; 24(2):127-136.

Cançado RD, Guglielmi AC, Vergueiro CS, Rolim EG, Figueiredo MS, Chiattoni CS. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. *Sao Paulo Med J*. 2006 Mar 2;124(2):55-60.

Casanovas G, Swinkels DW, Altamura S, Schwarz K, Laarakkers CM, Gross HJ, Wiesneth M, Heimpel H, Muckenthaler MU. Growth differentiation factor 15 in patients with congenital dyserythropoietic anaemia (CDA) type II. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(8):811-6.

Charache S, Dover GJ, Moore RD, Eckert S, Ballas SK, Koshy M, Milner PF, Orringer EP, Phillips G Jr, Platt OS et al. Hydroxyurea: effects on hemoglobin F production in patients with sickle cell anemia. *Blood*. 1992 May 15;79(10):2555-65.

Cohen LA, Gutierrez L, Weiss A, Leichtmann-Bardoogo Y, Zhang DL, Crooks DR, Sougrat R, Morgenstern A, Galy B, Hentze MW, Lazaro FJ, Rouault TA, Meyron-Holtz EG. Serum ferritin is derived primarily from macrophages through a nonclassical secretory pathway. *Blood*. 2010 Sep 2;116(9):1574-84.

Costa FF, Tavella MH, Zago MA.  $\beta$ -thalassemia intermedia and IVS-1 NT6 homozygosis in Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1991;24:157-161.

Croisille L, Chiron M, Vainchenker W, Romeo PH, Rince P et al. Diamond-blackfan anemia with mutations in RPS19 gene: a different pattern of in vitro erythroid differentiation? *Blood*. 1999;94(10)suppl 1:414a.

Donovan A, Lima CA, Pinkus JL, Pinkus GS, Zon LI, Robine S, Andrews NC. The iron exporter ferroportin/Slc40a1 is essential for iron homeostasis. *Cell Metab*. 2005; 1:191–200.

Dörner MH, Salfeld J, Will H, Leibold EA, Vass JK, Munro HN. Structure of human ferritin light subunit messenger RNA: comparison with heavy subunit message and functional implications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985;82:3139-43.

Du X, She E, Gelbart T, Truksa J, Lee P, Xia Y, Khovananth K, Mudd S, Mann N, Moresco EM, Beutler E, Beutler B. The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency. *Science*. 2008;320:1088-92.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary hemochromatosis. *Nat Genet.* 1996; 13:399-408.

Finberg KE, Heeney MM, Campagna DR, Aydinok Y, Pearson HA, Hartman KR, Mayo MM, Samuel SM, Strouse JJ, Markianos K, Andrews NC, Fleming MD. Mutations in Tmprss6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA). *Nat Genet.* 2008;40:569-71.

Finkenstedt A, Bianchi P, Theurl I, Vogel W, Witcher DR, Wroblewski VJ, Murphy AT, Zanella A, Zoller H. Regulation of iron metabolism through GDF15 and hepcidin in pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol.* 2009 Mar;144(5):789-93.

Folgueras AR, Martin de Lara F, Pendas AM, Garabaya C, Rodriguez F, Astudillo A, Bernal T, Cabanillas R, López-Otín C, Velasco G. The membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis. *Blood.* 2008 Sep 15;112(6):2539-45.

Fung EB, Harmatz PR, Lee PD, Milet M, Bellevue R, Jeng MR, Kalinyak KA, Hudes M, Bhatia S, Vichinsky EP; Multi-Centre Study of Iron Overload Research Group. Increased prevalence of iron-overload associated endocrinopathy in thalassaemia versus sickle-cell disease. *Br J Haematol.* 2006 Nov;135(4):574-82

Furutani T, Hino K, Okuda M, Gondo T, Nishina S, Kitase A, Korenaga M, Xiao SY, Weinman SA, Lemon SM, Sakaida I, Okita K. Hepatic iron overload induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *Gastroenterology.* 2006;130:2087-2098.

Gaetano C, Massimo L, Alberto M. Control of iron homeostasis as a key component of macrophage polarization. *Haematologica*. 2010 Nov;95(11):1801-3.

Gambero S, Bezerra MAC, Lanaro C, Franco-Penteado CF, Fertrin KY, Mello MRB, Albuquerque DM, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Gene expression of the IL-6/STAT-3/HAMP signaling pathway in mononuclear cells in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009 Jun; 97:314 (abstract 0773).

Ganz T. Heparin in iron metabolism. *Curr Opin Hematol* 2004;11:251-4.

Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008;112:4292-4297

Gardenghi S, Marongiu MF, Ramos P, Guy E, Breda L, Chadburn A, Liu Y, Amariglio N, Rechavi G, Rachmilewitz EA, Breuer W, Cabantchik ZI, Wrighting DM, Andrews NC, de Sousa M, Giardina PJ, Grady RW, Rivella S. Ineffective erythropoiesis in beta-thalassemia is characterized by increased iron absorption mediated by down-regulation of hepcidin and up-regulation of ferroportin. *Blood*. 2007 Jun 1;109(11):5027-35

Harmatz P, Butensky E, Quirolo K, Williams R, Ferrell L, Moyer T, Golden D, Neumayr L, Vichinsky E. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood*. 2000 Jul 1;96(1):76-9.

Hentze MW, Muckenthaler MU, Andrews NC. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*. 2004 Apr 30;117(3):285-97.

Huang H, Constante M, Layoun A, Santos MM. Contribution of STAT3 and SMAD4 pathways to the regulation of hepcidin by opposing stimuli. *Blood*. 2009 Apr 9;113(15):3593-9.

Inati A, Musallam KM, Wood JC, Taher AT. Iron overload indices rise linearly with transfusion rate in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2980-1; author reply 2981-2.

Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *Br Med J*. 1972 Oct 28;4(5834):206-8.

Kato GJ, McGowan V, Machado RF, Little JA, Taylor J 6th, Morris CR, Nichols JS, Wang X, Poljakovic M, Morris SM Jr, Gladwin MT. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*. 2006 Mar 15;107(6):2279-85.

Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D, Ganz T, Weinstein DA, Cunningham MJ. Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer* 2007; 48:57–63.

Koorts AM, Levay PF, Hall AN, van der Merwe CF, Becker PJ, Viljoen M. Expression of the H-subunit and L-subunit of ferritin in bone marrow macrophages and cells of the erythron during cellular immune activation. *Blood Cells Mol Dis*. 2011 Jun 15;47(1):50-5.

Krause A, Nietz S, Magert HJ, Schultz A, Forssmann WG, Schultz-Knappe P, et al. LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. *FEBS Lett* 2000;480:147-50.

Kroot JJ, Laarakkers CM, Kemna EH, Biemond BJ, Swinkels DW. Regulation of serum hepcidin levels in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009 Jun;94(6):885-7.

Lebron JA, Bennett MJ, Vaughn DE, Chirino AJ, Snow PM, Mintier GA, Feder JN, Bjorkman PJ. Crystal structure of the hemochromatosis protein HFE and characterization of its interaction with transferrin receptor. *Cell*. 1998; 93:111-123.

Lee P, Peng H, Gelbart T, Wang L, Beutler E. Regulation of hepcidin transcription by interleukin 1 and interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005; 102:1906–1910.

Le Gac G, Dupradeau FY, Mura C, Jacolot S, Scotet V, Esnault G, Mercier AY, Rochette J, Férec C. Phenotypic expression of the C282Y/Q283P compound heterozygosity in HFE and molecular modeling of the Q283P mutation effect. *Blood Cell Mol Dis*. 2003; 30:231-237.

Linden T, Katschinski DM, Eckhardt K, Scheid A, Pagel H, Wenger RH. The antimycotic ciclopirox olamine induces HIF-1alpha stability, VEGF expression, and angiogenesis. *FASEB J*. 2003 Apr;17(6):761-3.

Liu XB, Nguyen NB, Marquess KD, Yang F, Haile DJ. Regulation of hepcidin and ferroportin expression by lipopolysaccharide in splenic macrophages. *Blood Cells Mol Dis*. 2005 Jul-Aug;35(1):47-56.

Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103:4159-67.

Makui H, Soares RJ, Jiang W, Constante M, Santos MM. Contribution of *Hfe* expression in macrophages to the regulation of hepatic hepcidin levels and iron loading. *Blood*. 2005; 106:2189-95.

Marziali G, Perrotti E, Ilari R, Testa U, Coccia EM, Battistini A. Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation. *Mol Cell Biol*. 1997 Mar;17(3):1387-95.

Melis MA, Cau M, Congiu R, Sole G, Barella S, Cao A, Westerman M, Cazzola M, Galanello R. A mutation in the TMPRSS6 gene, encoding a transmembrane serine protease

that suppresses hepcidin production, in familial iron deficiency anemia refractory to oral iron. *Haematologica*. 2008;93:1473-9.

Miura K; Taura K; Kodama Y; Schnabl B; Brenner D. Hepatitis C virus–induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology*. 2008; 48(5):1420-1429.

Mura C; Raguenes O; Ferec C. HFE mutation analysis in 711 hemochromatosis probands: evidence for S65C implication in mild forms of hemochromatosis. *Blood*. 1999; 8:2502-2505.

Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Hepcidin: A putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*. 2003;101:2461–2463.

Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, Ganz T. IL-6 mediated hypoferremia of inflammation by inducing synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *J Clin Invest*. 2004a; 113:1271–1276.

Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, Ganz T, Kaplan J. Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science*. 2004b; 306:2090–2093.

Nemeth E, Roetto A, Garozzo G, Ganz T, Camaschella C. Hepcidin is decreased in TFR2 hemochromatosis. *Blood*. 2005;105:1803–1806.

Nemeth E, Ganz T. Regulation of iron metabolism by hepcidin. *Annu Rev Nutr*. 2006, 26:323–42.

Nguyen NB, Callaghan KD, Ghio AJ, Haile DJ, Yang F. Heparin expression and iron transport in alveolar macrophages. *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006 Sep;291(3):L417-25

Nicolas G, Bennoun M, Devaux L, Beaumont C, Grandchamp B, Kahn A, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:8780-5.

Nicolas G, Bennoun M, Porteu A, Mativet S, Beaumont C, Grandchamp B, Sirito M, Sawadogo M, Kahn A, Vaulont S. Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:4596-4601.

Nicolas G, Chauvet C, Viatte L, Danan JL, Bigard X, Devaux I, Beaumont C, Kahn A, Vaulont S. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation. *J Clin Invest*. 2002;110:1037-1044.

Northrop-Clewes CA. Interpreting indicators of iron status during an acute phase response--lessons from malaria and human immunodeficiency virus. *Ann Clin Biochem*. 2008 Jan;45(Pt 1):18-32

Oliveira TM, Souza FP, Jardim AC, Cordeiro JA, Pinho JR, Sitnik R, Estevão IF, Bonini-Domingos CR, Rahal P. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. *Braz J Med Biol Res*. 2006 Dec;39(12):1575-80

Oliveira VC, Caxito FA, Gomes KB, Castro AM, Pardini VC, Ferreira AC. Frequency of the S65C mutation in the hemochromatosis gene in Brazil. *Genet Mol Res*. 2009 Jul 14;8(3):794-8.

Olivieri NF. The  $\beta$ -thalassemias. *N Engl J Med*. 1999;341:99-109.

Olivieri NF, Weatherall DJ. Clinical aspects of  $\beta$  thalassemia. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, New York: Cambridge University Press; 2001, p. 277-341.

Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, Nemeth E. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in  $\beta$ -thalassemia. *Haematologica*. 2007; 92:583–588.

Pak M, Lopez MA, Gabayan V, Ganz T, Rivera S. Suppression of hepcidin during anemia requires erythropoietic activity. *Blood*. 2006; 108:3730–3735.

Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem*. 2001;276:7806-7810.

Patel N, Gonsalves CS, Malik P, Kalra VK. Placenta growth factor augments endothelin-1 and endothelin-B receptor expression via hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Blood*. 2008 Aug 1;112(3):856-65.

Pericole FV, Alves MA, Saad ST, Costa FF. Hemochromatosis (HFE) gene mutations in Brazilian chronic hemodialysis patients. *Braz J Med Biol Res*. 2005 Sep;38(9):1321-4

Perutz MF. Submicroscopic structure of the red cell. *Nature*. 1948;161:204-205.

Perutz MF. Molecular anatomy and physiology of hemoglobin. In: Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Nagel RL, editors. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management, New York: Cambridge University Press; 2001, p. 174-196.

Perutz MF, Lehmann H. Molecular pathology of human haemoglobin. *Nature*. 1968;219:902-9.

Peyssonaux C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, Nizet V, Johnson R. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest.* 2007;117:1926-32.

Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, Leroyer P, Turlin B, Brissot P, Loréal O. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. *J Biol Chem.* 2001;276:7811-7819.

Pietrangelo A. Hemochromatosis: An endocrine liver disease. *Hepatology.* 2007;46:1291-1301.

Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F, Porto G. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBP $\alpha$ . *Blood.* 2008;111:5727-33.

Piperno A, Girelli D, Nemeth E, Trombini P, Bozzini C, Poggiali E, Phung Y, Ganz T, Camaschella C. Blunted hepcidin response to oral iron challenge in HFE-related hemochromatosis. *Blood.* 2007 Dec 1;110(12):4096-100

Platt OS. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *N Engl J Med.* 2008 Mar 27;358(13):1362-9.

Porter JB, Huehns ER. Transfusion and exchange transfusion in sickle cell anaemias, with particular reference to iron metabolism. *Acta Haematol.* 1987;78(2-3):198-205.

Roetto A, Papanikolaou G, Politou M, Alberti F, Girelli D, Christakis J, Loukopoulos D, Camaschella C. Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. *Nat Genet.* 2003;33:21-22.

Santos PC, Cançado RD, Terada CT, Rostelato S, Gonzales I, Hirata RD, Hirata MH, Chiattonne CS, Guerra-Shinohara EM. HFE gene mutations and iron status of Brazilian blood donors. *Braz J Med Biol Res.* 2010 Jan;43(1):107-14.

Santos PC, Cançado RD, Pereira AC, Schetttert IT, Soares RA, Pagliusi RA, Hirata RD, Hirata MH, Teixeira AC, Figueiredo MS, Chiattonne CS, Krieger JE, Guerra-Shinohara EM. Hereditary hemochromatosis: mutations in genes involved in iron homeostasis in Brazilian patients. *Blood Cells Mol Dis.* 2011 Apr 15;46(4):302-7.

Sargent PJ, Farnaud S, Evans RW. Structure/function overview of proteins involved in iron storage and transport. *Curr Med Chem.* 2005; 12:2683-93.

Shike H, Shimizu C, Lauth X, Burns JC. Organization and expression analysis of the zebrafish hepcidin gene, an antimicrobial peptide gene conserved among vertebrates. *Dev Comp Immunol.* 2004 Jun;28(7-8):747-54.

Steinberg MH, Forget BG, Higgs DR, Weatherall DJ. Disorders of Hemoglobin – Genetics, Pathophysiology and Clinical Management (Ed.). New York, Cambridge University Press, 2009; 826p. v.1

Tamagnini GP, Lopes MC, Castanheira ME, Wainscoat JS.  $\beta$ -thalassemia – Portuguese type: clinical, haematological and molecular studies of a newly defined form of  $\beta$ -thalassemia. *Brit J Hematol* 1983; 54:198-200.

Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, Tanno T, Miller JL. Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood.* 2008; 112:5241-5244.

Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. High

levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med.* 2007; 13:1096–1101.

Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, Lee YT, Goodnough JB, Harandi O, Ganz T, Paulson RF, Miller JL. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood.* 2009 Jul 2;114(1):181-6.

Tanno T, Rabel A, Lee YT, Yau YY, Leitman SF, Miller JL. Expression of growth differentiation factor 15 is not elevated in individuals with iron deficiency secondary to volunteer blood donation. *Transfusion.* 2010 Jul;50(7):1532-5.

Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, Zoller H, Bellmann-Weiler R, Niederegger H, Talasz H, Weiss G. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood.* 2008 Feb 15;111(4):2392-9

Theurl M, Theurl I, Hochegger K, Obrist P, Subramaniam N, van Rooijen N, Schuemann K, Weiss G. Kupffer cells modulate iron homeostasis in mice via regulation of hepcidin expression. *J Mol Med (Berl).* 2008 Jul;86(7):825-35.

Torres FR, Souza-Neiras WC, D'Almeida Couto AA, D'Almeida Couto VS, Cavasini CE, Rossit AR, Machado RL, Bonini-Domingos CR. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. *Genet Mol Res.* 2008 Jan 25;7(1):60-4.

Trinder D, Fox C, Vautier G, Olynk JK. Molecular pathogenesis of iron overload. *Gut.* 2002;51:290-5.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002; 3(7): 1-12.

Van Dijk BA, Laarakkers CM, Klaver SM, Jacobs EM, van Tits LJ, Janssen MC, Swinkels DW. Serum hepcidin levels are innately low in HFE-related haemochromatosis but differ between C282Y-homozygotes with elevated and normal ferritin levels. *Br J Haematol*. 2008 Sep;142(6):979-85.

Viatte L, Nicolas G, Lou DQ, Bennoun M, Lesbordes-Brion JC, Canonne-Hergaux F, Schönig K, Bujard H, Kahn A, Andrews NC, Vaulont S. Chronic hepcidin induction causes hyposideremia and alters the pattern of cellular iron accumulation in hemochromatotic mice. *Blood*. 2006; 107:2952-8.

Vichinsky E, Butensky E, Fung EH, Hudes M, Theil E, Ferrell L, Williams R, Louie L, Lee PD, Harmatz P. Comparison of organ dysfunction in transfused patients with SCD or beta thalassemia. *Am J Hematol*. 2005 Sep;80(1):70-4.

Vokurka M, Krijt J, Sulc K, Necas E. Hepcidin mRNA levels in mouse liver respond to inhibition of erythropoiesis. *Physiol Res*. 2006;55(6):667-74.

Walter PB, Fung EB, Killilea DW, Jiang Q, Hudes M, Madden J, Porter J, Evans P, Vichinsky E, Harmatz P. Oxidative stress and inflammation in iron-overloaded patients with beta-thalassaemia or sickle cell disease. *Br J Haematol*. 2006;135:254–263

Walter PB, Harmatz P, Vichinsky E. Iron metabolism and iron chelation in sickle cell disease. *Acta Haematol*. 2009;122(2-3):174-83.

Wang RH, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, Cooperman S, Eckhaus M, Rouault T, Mishra L, Deng CX. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression. *Cell Metab*. 2005 Dec;2(6):399-409.

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;100:3776-3781.

Weiss G, Graziadel I, Urbanek M, Grunewald K, Vogel W. Divergent effects of alpha 1-antitrypsin on the regulation of iron metabolism in human erythroleukaemic (K562) and myelomonocytic (THP-1) cells. *Biochem J*. 1996;319: 897-902.

Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anemias. *Blood Rev*. 2006;20:299-318.

Wun T, Cordoba M, Rangaswami A, Cheung AW, Paglieroni T. Activated monocytes and platelet-monocyte aggregates in patients with sickle cell disease. *Clin Lab Haematol*. 2002 Apr;24(2):81-8.

Zhang DL, Senecal T, Ghosh MC, Ollivierre-Wilson H, Tu T, Rouault TA. Hepcidin regulates ferroportin expression and intracellular iron homeostasis of erythroblasts. *Blood*. 2011 Jun 23 [epub ahead of print]

Zhang KH, Tian HY, Gao X, Lei WW, Hu Y, Wang DM, Pan XC, Yu ML, Xu GJ, Zhao FK, Song JG. Ferritin heavy chain-mediated iron homeostasis and subsequent increased reactive oxygen species production are essential for epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2009 Jul 1;69(13):5340-8.

Zurlo MG, De Stefano P, Borgna-Pignatti C, Di Palma A, Piga A, Melevendi C, Di Gregorio F, Burattini MG, Terzoli S. Survival and causes of death in thalassaemia major. *Lancet*. 1989;2:27-30.

*Anexos*

---



## Anexo I – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da FCM/UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

[www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html](http://www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html)

CEP, 17/02/09.  
(Grupo III)

**PARECER CEP:** Nº 057/2009 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)  
**CAAE:** 0042.0.146.000-09

### I - IDENTIFICAÇÃO:

**PROJETO: “METABOLISMO DO FERRO EM CÉLULAS HEMATOPOÉTICAS NAS HEMOGLOBINOPATIAS E EM ESTADOS DE SOBRECARGA DE FERRO”.**

**PESQUISADOR RESPONSÁVEL:** Kleber Yotsumoto Fertrin

**INSTITUIÇÃO:** Hemocentro/UNICAMP

**APRESENTAÇÃO AO CEP:** 09/02/2009

**APRESENTAR RELATÓRIO EM:** 17/02/10 (O formulário encontra-se no *site* acima)

### II - OBJETIVOS

Caracterização o papel da hepcidina produzida em células hematopoéticas na homeostase do ferro, em pacientes portadores de diferentes tipos de anemia e em estados de sobrecarga de ferro.

### III - SUMÁRIO

Será avaliada a expressão das proteínas através de reação em cadeia de polimerase utilizando RNA mensageiro extraído das células hematopoéticas de sangue periférico de pacientes em seguimento ambulatorial no Hemocentro-UNICAMP. A análise quantitativa da expressão gênica permitirá avaliar a regulação diferencial de cada um desses genes em função dos diferentes estados de sobrecarga de ferro e de hemólise crônica nesses indivíduos. A obtenção de novos conhecimentos sobre esses mecanismos regulatórios pode ajudar no esclarecimento da fisiopatologia e contribuir para novos alvos terapêuticos dos distúrbios envolvendo o metabolismo desse metal.

### IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Projeto bastante interessante e importante para melhor conhecimento dos mecanismos fisiológicos do ferro sérico, critérios de inclusão são claros, orçamento adequando, os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido são claros e pertinentes. Portanto do ponto de vista ético, não há nada que impeça sua realização.

### 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, resolve aprovar sem

---

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP  
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126  
Caixa Postal 6111  
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936  
FAX (019) 3521-7187  
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

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 II Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 17 de fevereiro de 2009.

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

# *Apêndices*

---



## 9.1.- Apêndice 1

Tabela de valores de significância das correlações entre expressão gênica de hepcidina (*HAMP*) e dados hematológicos e bioquímicos.

	HAMP	Ferrit	RBC	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	PCR	LDH	Ferro	TIBC	SatTf	Leuco	Neutro	Linfo	Mono	Plaq	Retic %	Ret abs	
HAMP		<b>0,0423</b>	0,0687	0,5932	0,1094	0,1460	0,1351	<b>0,0283</b>	0,5249	<b>0,0019</b>	0,5333	0,0799	0,7181	0,1699	0,2146	0,7997	0,6054	<b>0,0001</b>	0,4488	0,2238	HAMP
Ferritina	<b>0,0423</b>		0,6914	<b>0,0254</b>	0,4534	0,9359	0,7615	<b>0,0409</b>	0,4547	<b>0,0145</b>	0,2578	0,3574	0,5963	0,2049	0,1037	0,9643	0,2765	0,0566	0,9444	0,5331	Ferritina
RBC	0,0687	0,6914		<b>0,0148</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,6910	<b>0,0019</b>	0,9184	0,9875	0,8975	0,1120	0,1838	<b>0,0465</b>	0,2523	<b>0,0285</b>	<b>0,0140</b>	0,8772	RBC
Hb	0,5932	<b>0,0254</b>	<b>0,0148</b>		<b>0,0000</b>	0,9469	0,9984	0,6665	0,3694	0,7704	0,3825	0,8199	0,4098	<b>0,0417</b>	<b>0,0056</b>	0,9251	0,4121	0,2268	0,6564	0,5235	Hb
Ht	0,1094	0,4534	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>		0,0772	<b>0,0498</b>	0,1033	0,4228	0,3337	0,7146	0,8749	0,6645	0,0650	<b>0,0154</b>	0,6823	0,6900	0,8787	0,2666	0,4431	Ht
VCM	0,1460	0,9359	<b>0,0000</b>	0,9469	0,0772		<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	0,4065	<b>0,0154</b>	0,5895	0,6483	0,5652	0,8581	0,9860	0,1460	0,1514	<b>0,0147</b>	0,1052	0,7685	VCM
HCM	0,1351	0,7615	<b>0,0000</b>	0,9984	<b>0,0498</b>	<b>0,0000</b>		<b>0,0000</b>	0,4563	<b>0,0147</b>	0,6387	0,6485	0,5954	0,9337	0,9755	0,1612	0,2663	<b>0,0181</b>	0,1257	0,7110	HCM
CHCM	<b>0,0283</b>	<b>0,0409</b>	<b>0,0000</b>	0,6665	0,1033	<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>		0,5234	<b>0,0010</b>	0,9933	0,3109	0,7691	0,2913	0,2815	0,4266	0,6010	<b>0,0031</b>	0,4030	0,4607	CHCM
PCR	0,5249	0,4547	0,6910	0,3694	0,4228	0,4065	0,4563	0,5234		0,7664	0,9071	0,9960	0,9717	0,5363	0,5066	0,7499	0,4311	0,4856	0,0503	0,0626	PCR
LDH	<b>0,0019</b>	<b>0,0145</b>	<b>0,0019</b>	0,7704	0,3337	<b>0,0154</b>	<b>0,0147</b>	<b>0,0010</b>	0,7664		0,8376	<b>0,0193</b>	0,2684	0,4445	0,6189	0,0560	0,8711	<b>0,0001</b>	0,6855	0,5059	LDH
Ferro	0,5333	0,2578	0,9184	0,3825	0,7146	0,5895	0,6387	0,9933	0,9071	0,8376		0,2607	<b>0,0000</b>	0,1107	0,2529	<b>0,0258</b>	0,2285	0,1106	0,6104	0,4981	Ferro
TIBC	0,0799	0,3574	0,9875	0,8199	0,8749	0,6483	0,6485	0,3109	0,9960	<b>0,0193</b>	0,2607		<b>0,0001</b>	0,5823	0,2126	0,0527	0,4252	<b>0,0136</b>	0,5500	0,2962	TIBC
SatTf	0,7181	0,5963	0,8975	0,4098	0,6645	0,5652	0,5954	0,7691	0,9717	0,2684	<b>0,0000</b>	<b>0,0001</b>		0,3042	0,6716	<b>0,0085</b>	0,6443	0,7799	0,9213	0,9544	SatTf
Leuco	0,1699	0,2049	0,1120	<b>0,0417</b>	0,0650	0,8581	0,9337	0,2913	0,5363	0,4445	0,1107	0,5823	0,3042		<b>0,0000</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0077</b>	<b>0,0139</b>	<b>0,0306</b>	0,0549	Leuco
Neutro	0,2146	0,1037	0,1838	<b>0,0056</b>	<b>0,0154</b>	0,9860	0,9755	0,2815	0,5066	0,6189	0,2529	0,2126	0,6716	<b>0,0000</b>		0,0271	0,0597	<b>0,0057</b>	<b>0,0445</b>	<b>0,0451</b>	Neutro
Linfo	0,7997	0,9643	<b>0,0465</b>	0,9251	0,6823	0,1460	0,1612	0,4266	0,7499	0,0560	<b>0,0258</b>	0,0527	<b>0,0085</b>	<b>0,0000</b>	<b>0,0271</b>		<b>0,0100</b>	0,8875	0,1709	0,5786	Linfo
Mono	0,6054	0,2765	0,2523	0,4121	0,6900	0,1514	0,2663	0,6010	0,4311	0,8711	0,2285	0,4252	0,6443	<b>0,0077</b>	0,0597	<b>0,0100</b>		0,2760	<b>0,0134</b>	<b>0,0048</b>	Mono
Plaquetas	<b>0,0001</b>	0,0566	<b>0,0285</b>	0,2268	0,8787	<b>0,0147</b>	<b>0,0181</b>	<b>0,0031</b>	0,4856	<b>0,0001</b>	0,1106	<b>0,0136</b>	0,7799	0,0139	<b>0,0057</b>	0,8875	0,2760		0,6625	0,1076	Plaquetas
Retic %	0,4488	0,9444	<b>0,0140</b>	0,6564	0,2666	0,1052	0,1257	0,4030	0,0503	0,6855	0,6104	0,5500	0,9213	<b>0,0306</b>	<b>0,0445</b>	0,1709	<b>0,0134</b>	0,6625		<b>0,0000</b>	Retic %
etic abs	0,2238	0,5331	0,8772	0,5235	0,4431	0,7685	0,7110	0,4607	0,0626	0,5059	0,4981	0,2962	0,9544	0,0549	<b>0,0451</b>	0,5786	<b>0,0048</b>	0,1076	<b>0,0000</b>		Retic abs
	HAMP	Ferrit	RBC	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	PCR	LDH	Ferro	TIBC	SatTf	Leuco	Neutro	Linfo	Mono	Plaq	Retic %	Ret abs	

## 9.2.- Apêndice 2

Tabela de valores de coeficientes das correlações entre expressão gênica de hepcidina (*HAMP*) e dados hematológicos e bioquímicos. Valores que obtiveram  $p < 0.05$  na análise estão em branco sobre fundo preto.

	HAMP	Ferrit	RBC	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	PCR	LDH	Ferro	TIBC	SatTf	Leuco	Neutro	Linfo	Mono	Plaq	Retic %	Ret abs	
HAMP		-0,340	-0,298	-0,089	-0,264	0,240	0,247	0,356	-0,121	0,493	-0,106	-0,292	0,061	-0,227	-0,206	-0,043	-0,087	-0,608	-0,134	-0,214	HAMP
Ferritina	-0,340		0,068	-0,372	-0,129	-0,014	-0,052	-0,342	0,147	-0,404	0,197	0,160	0,093	0,216	0,276	0,008	0,186	0,321	-0,013	0,114	Ferritina
RBC	-0,298	0,068		0,392	0,664	-0,774	-0,774	-0,626	0,076	-0,494	-0,017	-0,003	-0,022	-0,262	-0,220	-0,325	-0,190	0,356	-0,418	0,028	RBC
Hb	-0,089	-0,372	0,392		0,900	0,011	0,000	0,072	0,170	0,050	-0,148	-0,039	-0,140	-0,332	-0,441	0,016	0,137	-0,201	-0,079	0,113	Hb
Ht	-0,264	-0,129	0,664	0,900		-0,290	-0,321	-0,268	0,152	-0,163	-0,062	-0,027	-0,074	-0,302	-0,390	-0,069	0,067	0,026	-0,196	0,136	Ht
VCM	0,240	-0,014	-0,774	0,011	-0,290		0,988	0,731	0,157	0,395	0,092	-0,078	0,098	0,030	-0,003	0,240	0,237	-0,393	0,283	-0,052	VCM
HCM	0,247	-0,052	-0,774	0,000	-0,321	0,988		0,777	0,141	0,398	0,080	-0,077	0,090	0,014	-0,005	0,232	0,185	-0,381	0,268	-0,066	HCM
CHCM	0,356	-0,342	-0,626	0,072	-0,268	0,731	0,777		-0,121	0,519	-0,001	-0,171	0,050	-0,176	-0,179	0,133	0,088	-0,467	0,148	-0,131	CHCM
PCR	-0,121	0,147	0,076	0,170	0,152	0,157	0,141	-0,121		-0,058	0,023	-0,001	-0,007	0,118	0,126	0,061	-0,149	-0,132	0,380	0,363	PCR
LDH	0,493	-0,404	-0,494	0,050	-0,163	0,395	0,398	0,519	-0,058		0,035	-0,388	0,189	0,130	0,085	0,317	0,028	-0,611	0,073	-0,120	LDH
Ferro	-0,106	0,197	-0,017	-0,148	-0,062	0,092	0,080	-0,001	0,023	0,035		-0,190	0,881	0,267	0,193	0,366	0,203	0,267	0,092	0,122	Ferro
TIBC	-0,292	0,160	-0,003	-0,039	-0,027	-0,078	-0,077	-0,171	-0,001	-0,388	-0,190		-0,600	0,093	0,210	-0,321	0,135	0,402	0,108	0,187	TIBC
SatTf	0,061	0,093	-0,022	-0,140	-0,074	0,098	0,090	0,050	-0,007	0,189	0,881	-0,600		0,174	0,072	0,426	0,078	0,048	0,018	-0,010	SatTf
Leuco	-0,227	0,216	-0,262	-0,332	-0,302	0,030	0,014	-0,176	0,118	0,130	0,267	0,093	0,174		0,899	0,666	0,426	0,396	0,371	0,332	Leuco
Neutro	-0,206	0,276	-0,220	-0,441	-0,390	-0,003	-0,005	-0,179	0,126	0,085	0,193	0,210	0,072	0,899		0,359	0,308	0,440	0,347	0,346	Neutro
Linfo	-0,043	0,008	-0,325	0,016	-0,069	0,240	0,232	0,133	0,061	0,317	0,366	-0,321	0,426	0,666	0,359		0,413	0,024	0,240	0,099	Linfo
Mono	-0,087	0,186	-0,190	0,137	0,067	0,237	0,185	0,088	-0,149	0,028	0,203	0,135	0,078	0,426	0,308	0,413		0,181	0,420	0,473	Mono
Plaquetas	-0,608	0,321	0,356	-0,201	0,026	-0,393	-0,381	-0,467	-0,132	-0,611	0,267	0,402	0,048	0,396	0,440	0,024	0,181		0,078	0,281	Plaquetas
Retic %	-0,134	-0,013	-0,418	-0,079	-0,196	0,283	0,268	0,148	0,380	0,073	0,092	0,108	0,018	0,371	0,347	0,240	0,420	0,078		0,846	Retic %
Retic abs	-0,214	0,114	0,028	0,113	0,136	-0,052	-0,066	-0,131	0,363	-0,120	0,122	0,187	-0,010	0,332	0,346	0,099	0,473	0,281	0,846		Retic abs
	HAMP	Ferrit	RBC	Hb	Ht	VCM	HCM	CHCM	PCR	LDH	Ferro	TIBC	SatTf	Leuco	Neutro	Linfo	Mono	Plaq	Retic %	Ret abs	

### **Apêndice 3 – Referências da produção científica durante a realização da Tese de Doutorado:**

#### Artigo:

Fertrin KY, Costa FF. Genomic polymorphisms in sickle cell disease: implications for clinical diversity and treatment. *Expert Rev Hematol.* 2010 Aug;3(4):443-58.

#### Publicações em Anais de Congresso:

Fertrin KY, Bezerra MAC, Lanaro C, Franco-Penteado C, Gambero S, Mello MRB, Albuquerque DM, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Oxidative stress and gene expression of inflammatory mediators in mononuclear cells in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; 94(s2):314.

Gambero S, Bezerra MAC, Lanaro C, Franco-Penteado C, Fertrin KY, Mello MRB, Albuquerque DM, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Gene expression of the IL-6/STAT-3/HAMP signaling pathway in mononuclear cells in sickle cell disease. *Haematologica* 2009; 94(s2):314.

Bezerra MAC, Franco-Penteado CF, Lanaro C, Gambero S, Fertrin KY, Mello MRB, Albuquerque DM, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Increased platelet and neutrophil adhesion in sickle cell disease coorelates differently to variable levels of hemoglobin A. *Haematologica* 2009; 94(s2):87

Fertrin KY, Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Mello MRB, Bezerra MAC, Domingues BLBT, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Effects of high levels of growth differentiation factor 15 (GDF15) on hepcidin expression in monocytes of  $\beta$ -thalassemia intermedia patients. *ASH Annual Meeting Abstracts* 2009 114:4061

Bezerra MAC, Franco-Penteado CF, Lanaro C, Mello MRB, Gambero S, Albuquerque DM, Fertrin KY, Araujo AS, Costa FF. Inflammatory mediators are increased in leukocytes

of IVS-I-6 (T->C) homozygous  $\beta$ -thalassemia intermedia. ASH Annual Meeting Abstracts 2009 114:4068

Lanaro C, Franco-Penteado CF, Mello MRB, Fertrin KY, Bezerra MAC, Albuquerque DM, Conran N, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Upregulation of the anti-apoptotic protein survivin in hematopoietic cells in sickle cell anemia and effects of hydroxyurea therapy. ASH Annual Meeting Abstracts 2009 114:1532

Claudino MA, Franco-Penteado CF, Corat MAD, Gimenes AP, Fertrin KY, Passos LAC, Antunes E, Costa FF. Reduction of urinary bladder activity in transgenic sickle cell disease mice. ASH Annual Meeting Abstracts 2009 114:2580.

Pallis FR, Conran N, Fertrin KY, Saad STO, Costa FF, Franco-Penteado CF. Altered functional properties of eosinophils in sickle cell anemia and effects of hydroxyurea therapy. ASH Annual Meeting Abstracts 2009 114: 2656.

Fertrin KY, Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Mello MRB, Bezerra MAC, Domingues BLBT, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Hydroxyurea induces hepcidin expression in sickle cell anemia patients. ASH Annual Meeting Abstracts 2010 116:2653.

## ARTIGO EM SUBMISSÃO

Hydroxyurea induces hepcidin expression in monocytes in sickle cell anemia patients

Kleber Yotsumoto Fertrin,<sup>1</sup> Carolina Lanaro,<sup>1</sup> Carla Fernanda Franco-Penteado,<sup>1</sup> Dulcinéia Martins de Albuquerque,<sup>1</sup> Mariana R. Bandeira de Mello,<sup>1</sup> Marcos André Cavalcanti Bezerra,<sup>2</sup> Betânia Lucena Domingues Hatzlhofer,<sup>3</sup> Aderson S. Araújo,<sup>3</sup> Fernando Ferreira Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology and Hemotherapy Center, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>2</sup>Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco - UFPE, Recife, Brazil; <sup>3</sup>HEMOPE - Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco, Recife, Brazil

Corresponding Author: Fernando Ferreira Costa, M.D., PhD.  
Centro de Hematologia e Hemoterapia  
Faculdade de Ciências Médicas  
Rua Carlos Chagas, 480  
Cidade Universitária Zeferino Vaz  
Distrito de Barão Geraldo  
Campinas, SP 13083-878  
Brazil  
Tel: +55 19 3521 8734  
Fax: +55 19 3289 1089  
ferreira@unicamp.br

Running Title: Monocytic hepcidin in sickle cell anemia

Abstract word count: 222

Text word count: 1195

Figures/Tables: 3 (plus 3 supplemental Figures)

Reference count: 6

## Abstract

Hepcidin (gene *HAMP*) is a key regulator of iron metabolism. Although mainly produced by the liver, hepcidin is also known to be synthesized by monocytic-macrophagic cells. It prevents iron export from cells absorbing and storing iron, explaining why its upregulation in chronic inflammatory diseases decreases iron bioavailability causing anemia of inflammation. Sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemoglobinopathy recognized as a chronic inflammatory state, and leukocytes, including monocytes, take part in the typical vaso-occlusive process. Little is known about the role of iron and hepcidin in SCA. We have previously shown that hepcidin is overexpressed in mononuclear cells in SCA patients. Here we demonstrate that monocytic hepcidin gene expression is neither associated with markers of total body iron stores, such as ferritin or transferrin saturation, nor with inflammatory markers, such as C reactive protein. GDF-15, a downregulator of hepatic hepcidin, was increased in SCA patients, and negatively correlated with *HAMP* expression in monocytes. *HAMP* upregulation was shown in monocytes from patients with SCA on hydroxyurea (HU) treatment, and we present evidence that HU is able to upregulate hepcidin in a monocytic cell lineage *in vitro*. We hypothesize that the monocyte-derived counterpart of hepcidin may have alternative functions not directly related to iron metabolism. This is the first description of monocytic hepcidin in SCA and the influence of HU on its expression.

## Introduction

The antimicrobial peptide hormone hepcidin is a key regulator of iron metabolism. Hepcidin is encoded by the *HAMP* gene, and it binds to ferroportin, the only iron exporter found in mammals cells, internalizes it and leads to its degradation, thus preventing iron export from duodenal cells during iron absorption, and from hepatic and monocytic-macrophagic cells that store iron. This mechanism explains why upregulation of hepcidin by chronic inflammatory stimuli, such as increased serum IL-6, leads to anemia of inflammation.

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited hemoglobinopathy caused by a single point mutation leading to the production of a structurally abnormal hemoglobin, hemoglobin S, capable of polymerizing itself inside the red blood cells, causing sickling, vaso-occlusion and hemolytic anemia. It is now well accepted that SCA is a chronic inflammatory disease, and that leukocytes play an important role in the vaso-occlusive process. Little is known about how iron contributes to this process, despite iron overload being a well characterized complication of transfusion therapy in SCA patients. Moreover, hepcidin levels have been studied in very small cohorts of SCA patients, leaving a large area of research to be explored.

Although mainly produced in the liver, hepcidin is also known to be synthesized by monocytic-macrophagic cells<sup>1</sup>. We have previously shown that hepcidin is overexpressed in mononuclear cells in patients with sickle cell anemia (SCA)<sup>2</sup>, but the causes for this increased expression and whether monocyte-derived hepcidin production in this setting is related to iron metabolism remains unknown.

## Subjects and Methods

To gather further insight into the role of hepcidin in monocytes, we collected peripheral blood samples from adult SCA patients in regular follow-up at the Hematology and Hemotherapy Center of Pernambuco (HEMOPE) (n=53), in steady state and without previous history of transfusion in the past 3 months, and normal age- and race-matched controls (CTRL, n=13) for assessment of hematological parameters, biochemical markers of iron status (serum iron and transferrin saturation - TfSat), hemolysis (lactate dehydrogenase - LDH) and inflammation (C reactive protein - CRP), and separation of peripheral blood monocytes by Ficoll-Hypaque and Percoll gradients for gene expression analyses of genes involved in iron metabolism signaling (*HAMP* encoding hepcidin, and three genes belonging to different pathways known to influence hepcidin expression,

*STAT3*, *SMAD4* and *TLR4*). Plasma GDF-15 levels were also measured, as this protein has been shown to be a potent downregulator of hepcidin<sup>3</sup>. SCA patients were further stratified according to the number of previous blood transfusions and to treatment with hydroxyurea (HU). All patients were in steady-state, had no history of iron chelation treatment and were not enrolled in a regular transfusion program. 18 patients were receiving HU and 15 from the non-HU group had received over 20 blood transfusions during their lifetime. In the experiments using the THP-1 cell lineage, cells were cultured in RPMI medium enriched with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and were submitted to treatment with water as control, or HU dissolved in water in increasing concentrations (100µM, 400µM and 1600µM) for 6 hours (n≥4). Cell viability was evaluated by vital staining.

## Results and Discussion

As expected, SCA patients had elevated LDH levels, but no differences were found between control and SCA groups regarding serum iron, TfSat or CRP levels. Except for a higher red cell mean corpuscular volume, hematological parameters from patients on HU did not differ significantly from patients not using HU (Table 1).

Plasma GDF-15 levels were higher in SCA patients (2146±506.4pg/mL) than in control individuals (228.5±21.0pg/mL, p<0.0001) (Table 1), but no statistical difference was found between patients according to hydroxyurea treatment.

Among the genes studied, *HAMP* expression was significantly increased in the SCA group as a whole compared to the CTRL group, but SCA patients on HU had higher levels of monocytic hepcidin expression when compared to the remaining individuals (Figure 1).

We found no significant correlations between monocytic hepcidin expression and hemoglobin levels, hematocrit, leukocyte or reticulocyte counts, LDH, CRP levels (data not shown), serum iron or TfSat (p>0.05) (supplemental Figure 1). Regarding cellular signaling capable of stimulating *HAMP* transcription, gene expression analyses showed no differences in the expression of LPS receptor *TLR4* gene, or in the expression of other genes, such as *SMAD4* (involved in BMP-mediated hepcidin production) or *STAT3* (downstream of IL-6-stimulated hepcidin transcription) (supplemental Figure 2).

A possible alternative cause for hepcidin upregulation unrelated to known mechanisms by IL-6, BMP6, LPS or GDF-15 could be an unexpected effect of hydroxyurea. To further investigate if HU was able to modulate hepcidin expression, we

performed experiments with THP-1, a human monocytic lineage, since *in vitro* analysis would allow us to exclude the influence of circulating cytokines elevated in SCA patients. Cell viability was not affected by treatment (>90% viable cells at all experiments). HU was able to increase *HAMP* gene transcription up to four times compared to untreated cells ( $p=0.03$ ) (Figure 2). Nevertheless, no change in *STAT3* and *SMAD4* expressions in THP-1 cells failed to confirm that a known specific pathway was activated by hydroxyurea ( $p>0.05$ ) (supplemental Figure 3).

We have shown that plasma GDF-15 levels in SCA patients are increased, and are associated with monocytic hepcidin downregulation, a regulatory mechanism similar to what has been described in hepatic cell lines. Studies looking into GDF-15 production in thalassemia syndromes and congenital dyserythropoietic anemia have been able to demonstrate the association of high GDF-15, low hepcidin and spontaneous iron overload. Liver-derived hepcidin has been shown to have a major role in iron metabolism, as outlined by several previous studies, and ferroportin internalization and degradation by hepcidin accounts for iron retention inside macrophages as outlined by studies on anemia of inflammation.

Hepcidin expression is upregulated in monocytes in SCA patients, but is not correlated with serum iron, serum ferritin or transferrin saturation, possibly indicating that hepcidin production by monocytes has a different function in this cell type, not directly related to body iron control. *HAMP* expression is particularly increased in SCA patients receiving HU, and this drug was capable of inducing expression of *HAMP* in THP-1 cells, independently from inflammatory cytokine-mediated stimulation. This model has several limitations, considering THP-1 is an immortalized leukemic cell line, much different from a mature peripheral blood monocyte, subject to cell-cell interactions with other blood cells and endothelial cells and to circulating cytokines, which have been shown to be increased in sickle cell anemia patients. Nevertheless, this experiment demonstrates a proof-of-principle of the potential hepcidin agonistic effect of hydroxyurea, which may be explored in the future as a therapeutic intervention for diseases in which monocytic hepcidin deficiency may be found relevant.

Our data show that monocyte-derived hepcidin does not seem to be directly influenced by iron status and may have other functions. Some studies have demonstrated that hepcidin in other species has anti-inflammatory effects *in vitro*<sup>4-5</sup>, and that patients with SCA on HU shift to a lower inflammatory status<sup>6</sup>. Thus, monocytic hepcidin overexpression might be a natural response against the chronic inflammatory state in SCA, and HU

treatment may enhance this response. This is the first description of monocyte-derived hepcidin in SCA and the influence of HU on its expression.

#### Authorship and Disclosures

KYF designed the study and drafted the paper. KYF, CL, CFF, MACB, MRBM and BLDH collected data, samples and performed laboratory experiments. DMA contributed vital analytical reagents. KYF and FFC analyzed and interpreted data. ASA, STOS and FFC are responsible for the outpatient clinics. DMA, STOS and FFC revised the paper.

Conflict-of-interest disclosures: No relevant conflicts of interest to declare.

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, 13083-878, Brazil; e-mail: ferreira@unicamp.br

#### References

1. Theurl I, Theurl M, Seifert M, Mair S, Nairz M, Rumpold H, Zoller H, Bellmann-Weiler R, Niederegger H, Talasz H, Weiss G. Autocrine formation of hepcidin induces iron retention in human monocytes. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2392-9.
2. Gambero S, Bezerra MAC, Lanaro C, Franco-Penteado CF, Fertrin KY, Mello MRB, Albuquerque DM, Saad STO, Araujo AS, Costa FF. Gene expression of the IL-6/STAT-3/HAMP signaling pathway in mononuclear cells in sickle cell disease. *Haematologica*. 2009 Jun suppl2 94:314-314.
3. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, Moroney JW, Reed CH, Luban NL, Wang RH, Eling TE, Childs R, Ganz T, Leitman SF, Fucharoen S, Miller JL. High levels of GDF15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. 2007 Sep;13(9):1096-101.
4. De Domenico I, Zhang TY, Koenig CL, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner JP, Li D, Ward DM, Kaplan J. Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J Clin Invest*. 2010 Jul 1;120(7):2395-405.
5. Hsieh JC, Pan CY, Chen JY. Tilapia hepcidin (TH)2-3 as a transgene in transgenic fish enhances resistance to *Vibrio vulnificus* infection and causes variations in immune-related genes after infection by different bacterial species. *Fish Shellfish Immunol*. 2010 Sep;29(3):430-9.

6. Lanaro C, Franco-Penteado CF, Albuquerque DM, Saad ST, Conran N, Costa FF. Altered levels of cytokines and inflammatory mediators in plasma and leukocytes of sickle cell anemia patients and effects of hydroxyurea therapy. *J Leukoc Biol.* 2009 Feb;85(2):235-42.

#### Acknowledgments

Financial support by FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) and CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa).

**Table 1. Hematological and biochemical parameters in the groups participating in this study.**

<b>Parameters</b>	<b>CTRL</b> <i>(n=13)</i>	<b>SS</b> <i>(n=38)</i>	<b>SSHU</b> <i>(n=15)</i>	<b>Observation</b>
<b>Hb (g/dL)</b>	13.4 (1.0)	8.5 (1.3)	8.0 (1.8)	p<0.0001 (CTRL vs. SS/SSHU)
<b>Ht (%)</b>	40.3 (4.5)	26.1 (4.3)	24.6 (5.3)	p<0.0001 (CTRL vs. SS/SSHU)
<b>MCV (fL)</b>	87.0 (3.4)	96.4 (8.1)	108.0 (9.2)	p<0.01 (SSHU vs. SS)
<b>MCH (pg)</b>	28.5 (1.5)	31.6 (3.1)	35.7 (3.5)	NS
<b>Reticulocyte count (cells per mm<sup>3</sup>)</b>	31,832 (7,319)	211,903 (104,441)	151,924 (92,122)	p<0.0001 (CTRL vs. SS/SSHU)
<b>LDH (U/L)</b>	314 (78)	1218 (587)	1063 (455)	p<0.001 (CTRL vs. SS/SSHU)
<b>C reactive protein (ng/mL)</b>	0,23 (0,17)	0.58 (0.57)	0.51 (0.57)	NS
<b>Ferritin (ng/mL)</b>	145.21 (100.49)	550.10 (514.00)	1414.0 (2817.4)	p<0.05 (CTRL vs. SS/SSHU)
<b>Serum iron (ng/mL)</b>	94.0 (44.2)	118.3 (53.8)	110.0 (32.9)	NS
<b>Transferrin saturation (%)</b>	31.5 (1.4)	46.2 (25.1)	48.5 (23.0)	NS
<b>GDF-15 (pg/mL)</b>	240.6±74.7	2559.5±440.2	2771.6±3819.0	<b>p&lt;0.0001</b> (CTRL vs. SS/SSHU)

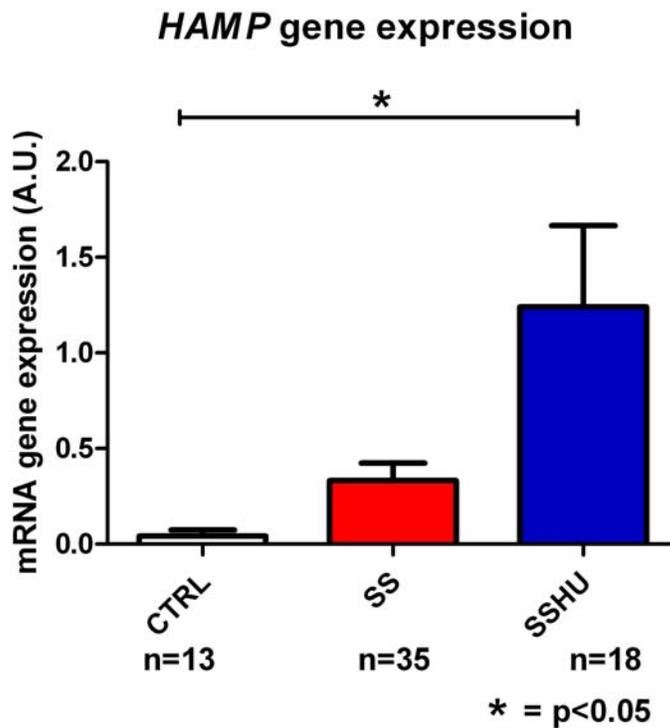
CTRL, healthy individuals; SS, sickle cell anemia patients; SSHU, sickle cell anemia patients under HU treatment; NS, not significant

Figure Legends

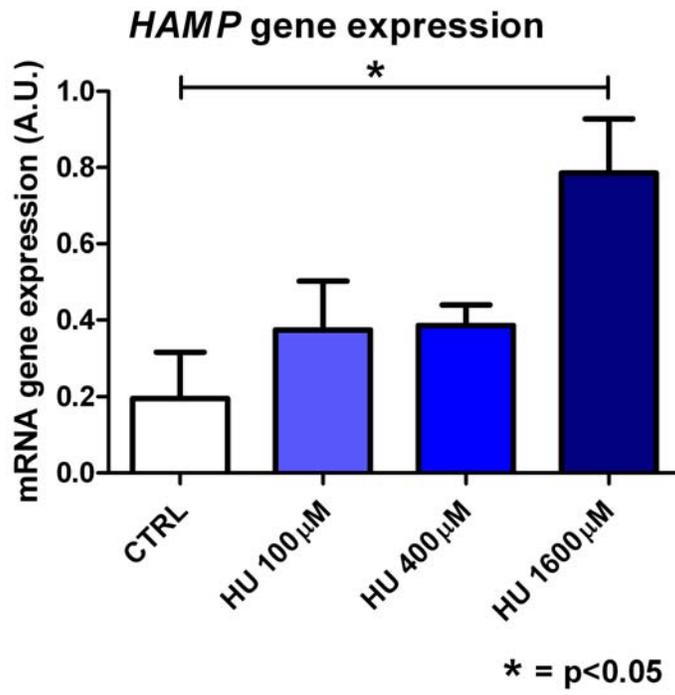
**Figure 1.** *HAMP* expression in circulating monocytes from controls (CTRL), non-treated sickle cell anemia patients (SS) and patients on hydroxyurea (SSHU).

**Figure 2.** *HAMP* gene expression in THP-1 cultures treated with increasing doses of hydroxyurea.

**Figure 1**



**Figure 2**



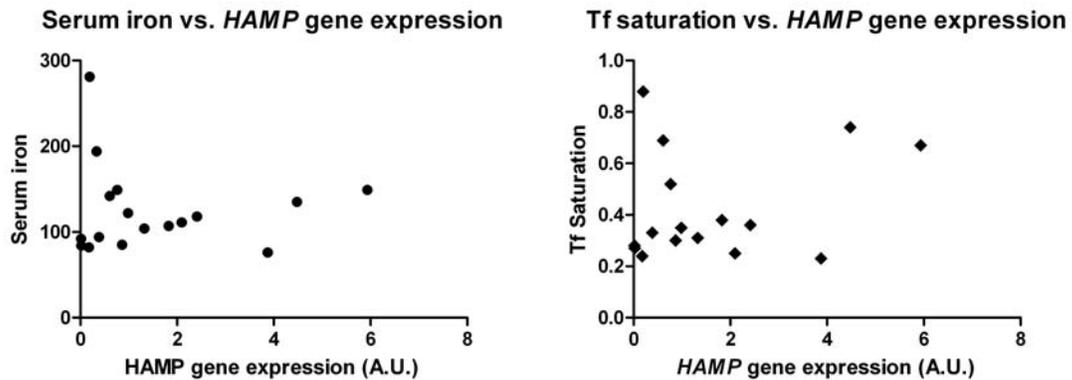
## Supplemental Figures Legends

**Supplemental Figure 1.** Correlations between monocytic hepcidin expression and serum iron and transferrin (Tf) saturation ( $p>0.05$ ).

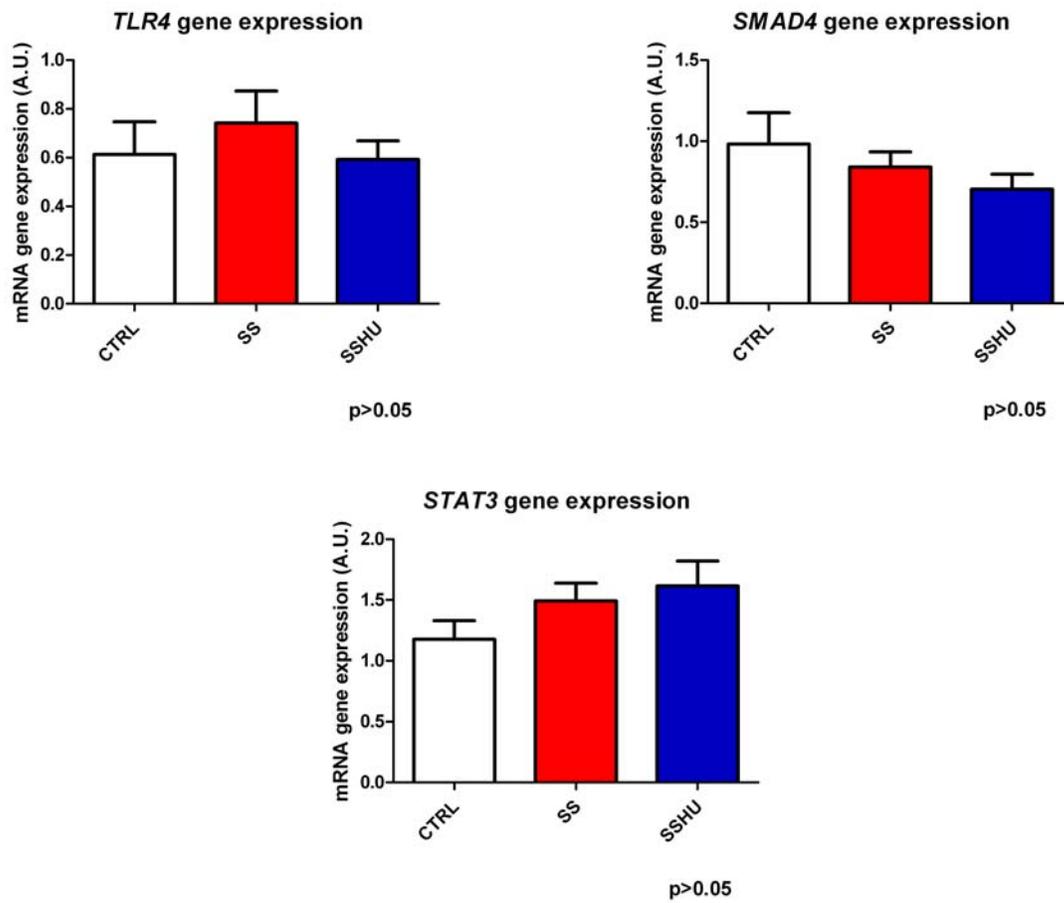
**Supplemental Figure 2.** Monocytic *STAT3*, *SMAD4* and *TLR4* gene expressions in controls (CTRL), sickle cell anemia patients without (SS) and with hydroxyurea.

**Supplemental Figure 3.** *STAT3* and *SMAD4* expressions in THP-1 cells treated with hydroxyurea ( $p>0.05$ ).

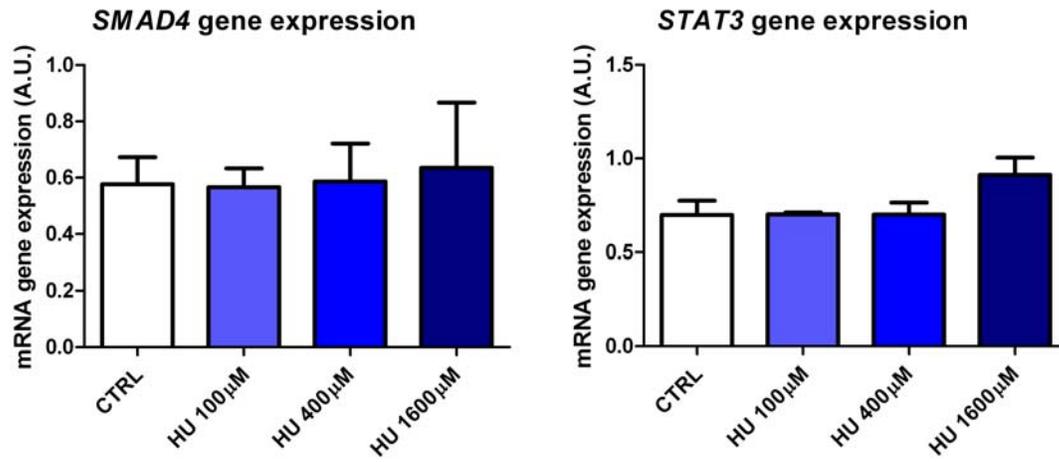
## Supplemental Figure 1



## Supplemental Figure 2



### Supplemental Figure 3



## ARTIGO EM SUBMISSÃO

Hepcidin and growth differentiation factor 15 in ineffective erythropoiesis of cobalamin deficiency anemia

Kleber Yotsumoto Fertrin,<sup>1</sup> Carolina Lanaro,<sup>1</sup> Carla Fernanda Franco-Penteado,<sup>1</sup> Flávia Rubia Pallis,<sup>1</sup> Dulcinéia Martins de Albuquerque,<sup>1</sup> Gordana Olbina,<sup>2</sup> Sara Teresinha Olalla Saad,<sup>1</sup> Mark Westerman<sup>2</sup> and Fernando Ferreira Costa<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematology and Hemotherapy Center, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>2</sup>Intrinsic LifeSciences, LLC, La Jolla, CA, USA

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, MD, PhD.  
Centro de Hematologia e Hemoterapia  
Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP  
Rua Carlos Chagas, 480  
Cidade Universitária Zeferino Vaz  
Distrito de Barão Geraldo  
Campinas, SP 13083-878  
Brazil  
Tel: +55 19 3521 8734  
Fax: +55 19 3289 1089  
ferreira@unicamp.br

Running Title: Hepcidin in cobalamin deficiency anemia

Abstract word count: 143

Text word count: 1027

Figures/Tables count: 3

Reference count: 17

## Abstract

Growth differentiation factor 15 is a member of the transforming growth factor beta superfamily characterized by its suppressive effect on the production of hepcidin, the key regulator of iron homeostasis. Ineffective erythropoiesis in patients with thalassemias, congenital dyserythropoietic anemias and pyruvate kinase deficiency has been associated with increased levels of growth differentiation factor 15 along with decreased hepcidin as a possible explanation for spontaneous iron overload. We therefore sought to study a cohort of patients with cobalamin deficiency anemia, a naturally occurring, reversible form of ineffective erythropoiesis. We present evidence that, differently from what has been observed in other anemias, although ineffective erythropoiesis in cobalamin deficiency is associated with high growth differentiation factor 15 levels, there is no hepcidin suppression or iron overload. Growth differentiation factor 15 overproduction may be necessary, but insufficient to account by itself for the influence of disturbed erythropoiesis on systemic iron absorption regulated by hepcidin.

## Introduction

Ineffective erythropoiesis (IE) in hereditary anemias such as thalassemia<sup>1</sup>, congenital dyserythropoietic anemias<sup>2,3</sup> and pyruvate kinase deficiency<sup>4</sup> has been shown to be associated with increased growth differentiation factor 15 (GDF-15) levels produced by apoptotic erythroblasts. GDF-15 is a negative regulator of hepcidin production and hepcidin deficiency is thought to be responsible for spontaneous iron overload in anemic states in which increased erythropoietic activity with prominent erythroblast apoptosis takes place<sup>5,6</sup>.

Cobalamin (or vitamin B12) deficiency is a naturally occurring, acquired cause of anemia with IE. Lack of vitamin B12 leads to impaired production of thymidylate, thus hampering adequate nucleic acid synthesis and normal cell proliferation. This generates bone marrow megaloblastosis, massive cell death of hematopoietic precursors and characteristic peripheral blood abnormalities, such as neutrophil hypersegmentation and macrocytic anemia, with or without other cytopenias.<sup>7</sup> Patients with megaloblastic anemia due to cobalamin deficiency can be promptly rescued with oral or parenteral administration of the lacking nutrient.<sup>8,9</sup>

We present first evidence that, differently from what has been observed in other anemias, although IE in cobalamin deficiency is associated with high GDF-15 levels, there is no suppression of hepcidin production or iron overload.

## Design and Methods

### Patients

Fourteen patients diagnosed with cobalamin deficiency anemia (mean age 55, 10 men) were compared with 17 healthy individuals (mean age 34, 10 men). The diagnosis was made based on cobalamin serum levels below 200pg/mL along with typical peripheral blood smear findings. Six patients were further studied between 7 and 10 days after treatment with daily 5mg intramuscular cobalamin injections and followed until complete normalization of their blood counts. Parenteral high dose cobalamin administration was chosen as it was the only locally available dosage form. This study was approved by the local ethics board and samples from both patients and controls were collected upon written informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki.

## Methods

GDF-15 plasma levels were measured with a Duo-Set enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (R&D Systems, Minneapolis, MN) following the manufacturer's protocol. Hepcidin plasma levels were measured with an ELISA-based assay system (Intrinsic LifeSciences, La Jolla, CA, USA), as previously described.<sup>10</sup> Complete blood counts were performed on a Cell-Dyn Sapphire equipment (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) and cell morphology was evaluated by optical microscopy. Serum total iron binding capacity (TIBC), ferritin, iron and lactate dehydrogenase (LDH) levels were measured at the Clinical Pathology Laboratory of the University of Campinas using routine standard assays. Transferrin saturation was calculated as serum iron/TIBC X 100, in %.

Quantitative variables were evaluated using analysis of variance, Friedman test or non-parametric Mann-Whitney test as appropriate. Spearman's rank correlation was used for calculating correlations between variables. A *P* value of less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were carried out using Prism 5 for Windows software package (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

## Results and Discussion

Hematological and biochemical data obtained are summarized in Table 1. Patients diagnosed with vitamin B12 deficiency had mean levels of serum cobalamin of 84.9pg/mL, LDH levels significantly higher than controls ( $p < 0.0001$ ), and none of them presented with biomarkers of iron overload (increased serum ferritin or transferrin saturation  $>45\%$ ,  $p > 0.05$  when compared to controls). All patients with cobalamin deficiency were advised to undergo upper gastrointestinal endoscopy to screen for gastric abnormalities and *Helicobacter pylori* infection. Six patients refused the procedure or were lost to follow-up. Six of 8 patients presented with atrophic body gastritis, 6 of 8 tested positive for *H. pylori*, either by urease test or gastric histology, and one patient had only moderate enanthematous gastritis but tested positive for parietal cell antibodies.

As expected, the comparison of hemoglobin levels (Figure 1A) and mean corpuscular volume measurements (Figure 1B) at diagnosis, after seven to ten days after starting treatment and after complete normalization of blood counts demonstrate that treatment was effective treatment in all patients with cobalamin deficiency. Initial high GDF-15 levels (Figure 1C) rapidly dropped after treatment was started, and decreased earlier than the hemoglobin levels. This corresponds to a prompt reversal of IE inside the bone marrow. A

previous study using radio-labeled molecules has reported erythropoiesis to resume to normal after 24 hours in pernicious anemia patients receiving adequate treatment.<sup>11</sup> In patients evaluated at the three time points (n=6), hepcidin levels were comparable to those found in healthy individuals at diagnosis, and these levels transiently decreased during treatment (Figure 1D). The temporary reduction in hepcidin production is probably secondary to an increase in bone marrow iron uptake to restore erythropoiesis, suggesting that systemic hepcidin production is probably more sensitive to brisk variations in iron bioavailability than to variation in GDF-15 production by erythroblasts. There was no correlation between GDF-15 and hepcidin levels in our population (Figure 2).

Cobalamin deficiency caused by pernicious anemia was the first disease used to define the concept of ineffective erythropoiesis<sup>12</sup>, a pathological situation in which anemia occurs in spite of a highly proliferating bone marrow because of premature erythroblast apoptosis. It is now also the first anemia described to associate IE with high GDF-15 production and absence of hepcidin suppression or consequent spontaneous iron overload. None of the patients evaluated presented with combined iron deficiency, a frequent association in atrophic gastritis that could have contributed to prevent overt iron overload in our cohort, and could have resulted in even lower baseline levels of hepcidin. Tanno et al<sup>13</sup> have found iron deficient blood donors to have decreased levels of hepcidin, although no abnormal overproduction of GDF-15 was present. Taken together, our data further corroborate the possibility that cytokines or small molecules other than GDF-15 may be important to regulate hepcidin and to consequently provide efficient crosstalk between the bone marrow and systemic iron absorption.<sup>14-17</sup>

In conclusion, we have presented data showing that GDF-15 production is increased in the presence of acquired IE due to cobalamin deficiency, but high levels of this cytokine do not cause hepcidin suppression and spontaneous iron overload in this setting as has been reported in other anemias with similar pathophysiology. Thus, we suggest that GDF-15 overproduction may be necessary, but insufficient to account by itself for the influence of disturbed erythropoietic activity on hepcidin production, and warrants the investigation of alternative intercellular pathways that control systemic iron levels.

#### Acknowledgments

The authors would like to thank Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue (INCTS), CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa) and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for financial support. We would also like to thank Prof.

Helena Zerlotti Wolf Grotto for biochemical analyses at the Clinical Pathology Laboratory of the University of Campinas.

#### Authorship and Disclosures

KYF designed the study, collected data and samples and drafted the paper. KYF, CL, CFF and FRP performed laboratory experiments. GO and MW performed the hepcidin ELISA assays. DMA contributed vital analytical reagents. KYF and FFC analyzed and interpreted data. STOS and FFC are responsible for the outpatient clinic. GO, MW, DMA, STOS and FFC revised the paper.

Conflict-of-interest disclosures: M.W. is an officer and has ownership interests in Intrinsic LifeSciences LLC (La Jolla, CA), holds U.S. patents on the hepcidin C-ELISA and related compositions, and has received honoraria from Centocor-Ortho R&D, Inc. G.O. is an employee and has ownership interests in Intrinsic LifeSciences LLC and is a co-developer of the hepcidin assay.

Correspondence: Fernando Ferreira Costa, Centro de Hematologia e Hemoterapia, Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, Rua Carlos Chagas, 480, Cidade Universitária Zeferino Vaz, Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, 13083-878, Brazil; e-mail: ferreira@unicamp.br

#### References

1. Tanno T, Bhanu NV, Oneal PA, Goh SH, Staker P, Lee YT, et al. High levels of GDF-15 in thalassemia suppress expression of the iron regulatory protein hepcidin. *Nat Med*. 2007;13(9):1096-101.
2. Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, Tanno T, Miller JL. Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood*. 2008;112:5241-5244.
3. Casanovas G, Swinkels DW, Altamura S, Schwarz K, Laarakkers CM, Gross HJ, et al. Growth differentiation factor 15 in patients with congenital dyserythropoietic anaemia (CDA) type II. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(8):811-6.
4. Finkenstedt A, Bianchi P, Theurl I, Vogel W, Witcher DR, Wroblewski VJ, et al. Regulation of iron metabolism through GDF-15 and hepcidin in pyruvate kinase deficiency. *Br J Haematol*. 2009;144(5):789-93.

5. Origa R, Galanello R, Ganz T, Giagu N, Maccioni L, Faa G, et al. Liver iron concentrations and urinary hepcidin in beta-thalassemia. *Haematologica*. 2007 May;92(5):583-8.
6. Kattamis A, Papassotiriou I, Palaiologou D, Apostolakou F, Galani A, Ladis V, et al. The effects of erythropoietic activity and iron burden on hepcidin expression in patients with thalassemia major. *Haematologica*. 2006 Jun;91(6):809-12.
7. Wickramasinghe SN. Diagnosis of megaloblastic anemias. *Blood Reviews*. 2006; 20:299-318.
8. Butler CC, Vidal-Alaball J, Cabbubgs-John R, McCaddon A, Hood K, Papaioannou A, et al. Oral vitamin B12 versus intramuscular vitamin B12 for vitamin B12 deficiency: a systematic review of randomized controlled trials. *Family Practice*. 2006;23:279-285.
9. AM Hvas, E Nexø. Diagnosis and treatment of vitamin B12 deficiency - an update. *Haematologica*. 2006 Nov; 91: 1506 - 1512.
10. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood*. 2008;112(10):4292-7.
11. Samson D, Halliday D, Chanarin I. Reversal of ineffective erythropoiesis in pernicious anaemia following vitamin B12 therapy. *Br J Haematol*. 1977;35(2):217-24.
12. Huff RL, Hennessy TG, Austin RE, Garcia JF, Roberts BM, Lawrence JH. Plasma and red cell iron turnover in normal subjects and in patients having various hematopoietic disorders. *J Clin Invest*. 1950;29(8):1041-1052.
13. Tanno T, Rabel A, Lee YT, Yau YY, Leitman SF, Miller JL. Expression of growth differentiation factor 15 is not elevated in individuals with iron deficiency secondary to volunteer blood donation. *Transfusion*. 2010;50(7):1532-5.
14. Tanno T, Porayette P, Sripichai O, Noh SJ, Byrnes C, Bhupatiraju A, et al. Identification of TWSG1 as a second novel erythroid regulator of hepcidin expression in murine and human cells. *Blood*. 2009;114(1):181-6.
15. Peyssonnaud C, Zinkernagel AS, Schuepbach RA, Rankin E, Vaulont S, Haase VH, et al. Regulation of iron homeostasis by the hypoxia-inducible transcription factors (HIFs). *J Clin Invest*. 2007;117(7):1926-32.
16. Pinto JP, Ribeiro S, Pontes H, Thowfeequ S, Tosh D, Carvalho F, et al. Erythropoietin mediates hepcidin expression in hepatocytes through EPOR signaling and regulation of C/EBPalpha. *Blood*. 2008;111(12):5727-33.
17. Silvestri L, Pagani A, Camaschella C. Furin-mediated release of soluble hemojuvelin: a new link between hypoxia and iron homeostasis. *Blood*. 2008;111(2):924-31.

**Table 1. Hematological and biochemical parameters of healthy individuals and patients with cobalamin deficiency anemia.**

	Healthy	Patients with cobalamin deficiency anemia		
	individuals	At diagnosis	After 7-10 days of treatment	After normal CBC
	(n=17)	(n=14)	(n=6)	(n=6)
Hemoglobin (g/dL)	13.4 ± 1.0	8.8 ± 1.5	10.7 ± 1.5	13.4 ± 1.0
Hematocrit (%)	40.3 ± 4.5	27.3 ± 6.0	31.3 ± 4.5	40.0 ± 3.9
MCV (fL)	87.0 ± 3.4	114.4 ± 9.9	110.7 ± 6.7	89.9 ± 4.5
MCH (pg)	28.5 ± 1.5	39.1 ± 3.5	36.6 ± 3.1	29.8 ± 2.2
Reticulocytes (cells/mm <sup>3</sup> )	31,832 ± 7,319	72,972 ± 49,464	163,868 ± 130,501	50,540 ± 28,101
Serum LDH (U/L)	314 ± 78	1,959 ± 2,288	ND	ND
Serum ferritin (ng/mL) <sup>1</sup>	145.2 ± 100.5	233.1 ± 156.4	ND	ND
Serum iron (ng/mL) <sup>1</sup>	94.0 ± 44.2	85.5 ± 12.3	ND	ND
Transferrin saturation (%) <sup>1</sup>	31.5 ± 1.4	33.0 ± 1.7	ND	ND
Plasma hepcidin (ng/mL)	80.46 ± 55.32 (11.90-186.70)	108.80 ± 87.39 (20.00-297.50)	46.25 ± 23.15 (26.50-75.80)	102.90 ± 49.38 (33.50-148.10)
Plasma GDF-15 (pg/mL)	311.5 ± 157.4 (121.0-776.1)	7,846.0 ± 7,388.0 (625.8-23,483.0)	1,088.0 ± 563.3 (521.0-1,773.0)	914.6 ± 552.5 (240.0-1,611.0)

Data are presented as mean ± SD (range).

CBC: complete blood count, MCV: mean corpuscular volume, MCH: mean corpuscular hemoglobin, LDH: lactate dehydrogenase, GDF-15: growth differentiation factor 15, ND: not determined.

<sup>1</sup>No statistically significant differences were detected by Mann-Whitney's test.

## Figure legends

**Figure 1. Hemoglobin, MCV, plasma GDF-15 and hepcidin in patients with cobalamin deficiency anemia.** Hemoglobin (A), MCV (B), plasma GDF-15 (C) and hepcidin (D) levels in patients with cobalamin deficiency are shown. The statistical significance was calculated by repeated measures ANOVA. DIAG: data from samples collected at diagnosis, D7-10: samples collected seven to ten days after starting treatment, NL: samples collected after complete normalization of peripheral blood counts, \*\*\* $p < 0.0001$ , \*\* $p = 0.0004$ , \* $p = 0.02$ .

**Figure 2. Correlation between GDF-15 and hepcidin levels in healthy individuals and cobalamin anemia patients.** Values of plasma hepcidin in both patients (■) and healthy individuals (○) are plotted against GDF-15 levels,  $p = 0.135$ , not significant (Spearman's correlation).

FIGURE 1

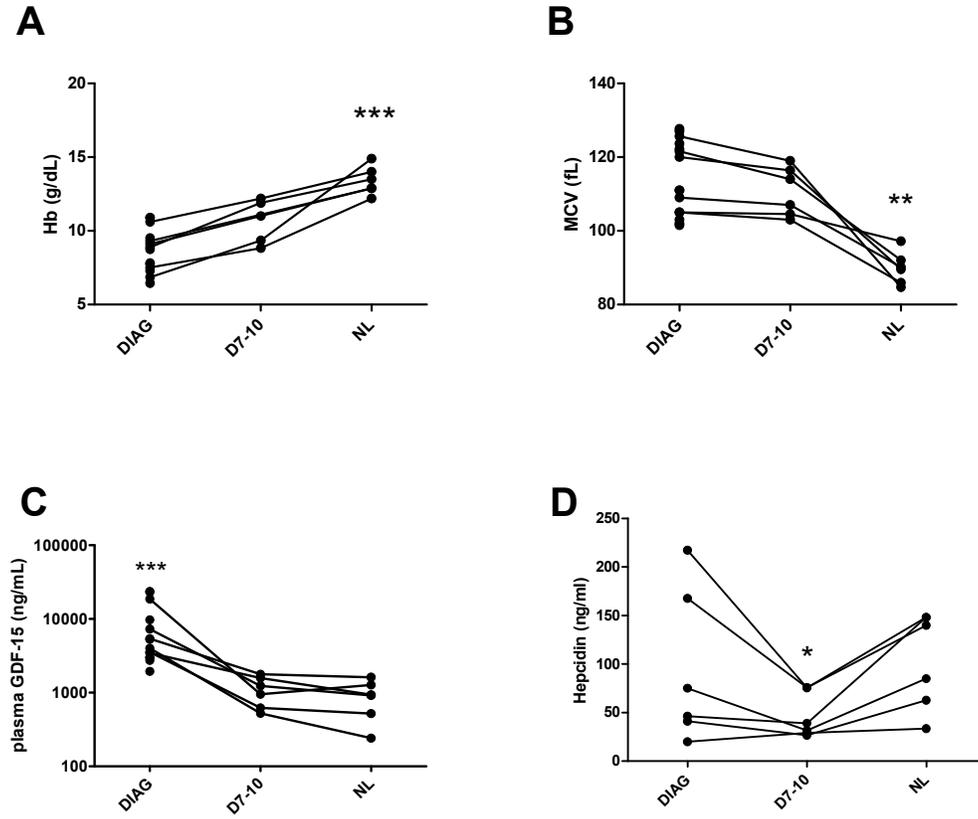


FIGURE 2

