

# AVALIAÇÃO DAS NECESSIDADES EM FERRO DURANTE O TRATAMENTO DA ANEMIA COM ERITROPOIETINA HUMANA RECOMBINANTE NOS DOENTES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÓNICA EM HEMODIÁLISE

C. OLIVEIRA, H. BOQUINHAS, A. GASPAR, T. ADRAÇÃO, J.M. BOQUINHAS, E.C. JUNIOR, J. SIMÕES

Serviço de Nefrologia. Nefroclínica. Hospital de Santa Cruz. Camaxide.

## RESUMO

A deficiência em ferro é uma ocorrência frequente nos doentes sob terapêutica com Eritropoietina Humana de Recombinação Genética (rhEPO) para a correção da anemia da insuficiência renal crónica (IRC). Estudámos 10 doentes com IRC em hemodiálise iterativa (HD), (♀=8, ♂=2), média de idades de 49 anos [32-37], tempo médio de permanência em HD de 44.2 ±25.0 meses. Apresentavam no início do estudo (Pré-rhEPO), valores médios de hemoglobina (Hb) 7.36 ±1.29gr/dl, ferritina 695.4 ±276.0ng/ml, siderémia 160.3 ±49.5 µg/dl, saturação da transferrina 55.3 ±12.6% e de transfusões nos 12 meses Pré-rhEPO de 10.9 ±3.2 Unidades. A rhEPO foi ministrada, pós-HD, na dose de 80U/kg de peso, 3x/Semana, no Período de Correção da anemia (P. Correção) (duração média 46.7 ±18.6 dias) e ulteriormente reduzida para manter a Hb entre valores >10 e <11gr/dl. Detectámos Deficit em Ferro (saturação da transferrina <16% ou ferritina <30ng/ml) em 5 dos 10-doentes e dividimos a população em 2 Grupos (GI - doentes que desenvolveram Deficit em Ferro; GII - doentes que nunca desenvolveram Deficit em ferro). Verificámos que o GI e GII apresentavam valores semelhantes, Pré-rhEPO, de siderémia, transferrina e saturação da transferrina. Em GI a ferritina era significativamente inferior a GII (GI=489.2 ±23.6ng/ml; GII=901.06 ±96.4ng/ml; p<0.01). Em GI, a saturação da transferrina desceu significativamente no P. Correção, aos 3, 6 e 12 meses e a ferritina aos 3, 6 e 12 meses em relação ao Pré-rhEPO; em GII não se observou descida significativa destes parâmetros. Com base nos valores Pré-rhEPO de ferritina e de Hb avaliamos as Reservas Disponíveis em Ferro, as Necessidades Calculadas para corrigir a Hb para 10.5gr/dl e o Balanço Previsto de Ferro. Dos 5 doentes com Balanço Previsto de Ferro negativo, 4 desenvolveram Deficit de Ferro. Dos 4 doentes com Balanço Previsto de Ferro positivo, nenhum desenvolveu Deficit de Ferro (p<0.05). Um doente foi excluído do estudo por perdas hemáticas. Concluímos que, mesmo com valores iniciais de ferritina superiores ao normal, é possível desenvolver Deficit em Ferro. Pode-se prever o desenvolvimento de Deficit de Ferro, com base na avaliação das Reservas Disponíveis em Ferro Pré-rhEPO e das Necessidades Previstas. A saturação de transferrina foi o parâmetro mais sensível e mais precoce para avaliar o Deficit Funcional em Ferro.

## SUMMARY

Iron needs during recombinant human erythropoietin therapy in chronic renal failure associated anemia

Iron deficiency occurs often in patients with recombinant human Erythropoietin (rhEPO) therapy in chronic renal failure (CRF) associated anemia. We have studied 10 patients with CRF on regular hemodialysis (HD), female=8, male=2, average age=49 [32 to 72], time on HD 44.2 ±25.0 months. Before starting rhEPO, the mean hemoglobin value was 7.36 ±1.29gr/dl, the mean ferritin 695.4 ±276.0ng/ml, the mean serum iron 160.3 ±49.5 µg/dl and the mean transferrin saturation 55.3 ±12.6%. Transfusional requirements in the 12 months Pré-rhEPO were 10.9 ±3.2 units. The rhEPO dose level was 80U/kg body weight (3 times a week, after HD) in the Correction Period (mean time=46.7 ±18.6 days), being reduced afterwards in order to remain target Hb stable between 10 and 11gr/dl. Iron deficiency was detected (transferrin iron saturation <16% or serum ferritin <30ng/ml) in 5 of the 10 patients. Patients have been divided into two Groups (GI - patients which developed iron deficiency; GII - patients which remained iron replete). There were no significant differences between GI and GII in the serum iron, transferrin and transferrin saturation values of the Pré-rhEPO. Serum ferritin in the Pré-rhEPO was lower in GI than GII (GI=489.2 ±23.6ng/ml; GII=901.6 ±96.4ng/ml; p<0.01). Falls in the transferrin iron saturation during the Correction Period and 3, 6 and 12 months and in the serum ferritin at 3, 6 and 12 months versus Pré-rhEPO have occurred. Based on the values of serum ferritin and Hb Pré-rhEPO we estimated Iron Reserves. Iron Needs for new hemoglobin synthesis from the difference between initial and target Hb concentrations and Net Projected Iron Stores. Of 5 patients whose Net Projected Iron stores were negative, 4 developed Iron deficiency. Of 4 patients whose Net Projected Iron stores were positive, none became Iron Depleted (p<0.05). One patient was withdrawn from the study due to external blood losses. We have concluded that even with initial serum ferritin values above normal ranges, iron deficiency may develop. It is possible to foresee the occurrence of Iron Deficiency by assessing body Iron Reserves and to predict Iron Needs for new Hb synthesis, based only in non invasive laboratorial parameters. Transferrin iron saturation was the most sensitive and valuable parameter to assess the functional iron deficiency.

## INTRODUÇÃO

A História da Eritropoietina tem o seu início com Denis Jourdanet e Paul Bert, que em meados do século XIX, constataram que o sangue de doentes que viviam nas zonas de alta altitude do México era mais espesso e viscoso por conter maior número

de glóbulos vermelhos, o que, deduziram, seria vantajoso para a sobrevivência em altas altitudes, onde existe uma menor pressão atmosférica<sup>1,2</sup>. Desde então foram múltiplas as etapas que conduziram à disponibilização da síntese da hormona em quantidades suficientes para poder ser usada em moldes terapêuticos. A associação da anemia com a insuficiência renal crónica, amplamente estabelecida por diversos autores foi originalmente descrita por Bright em 1836<sup>3</sup>. A regulação da eritropoiese por um

Recebido para publicação: 13 de Agosto de 1991

factor humoral que foi evidenciada por Erslev e colaboradores em 1953<sup>4</sup>. Em 1957 Jacobson e colaboradores<sup>5</sup> demonstraram o importante papel dos rins na produção de Eritropoietina e na formação de eritrócitos, tendo posteriormente Erslev em 1975<sup>6</sup> comprovado que o rim constituía também um local de síntese da referida hormona. A obtenção da hormona purificada<sup>7,8</sup> e posteriormente, com as técnicas de engenharia genética do clone de DNA que codifica a síntese de Eritropoietina humana e sua incorporação em células cultivadas, conseguida simultaneamente em dois laboratórios diferentes usando tecnologia essencialmente igual<sup>9-10</sup>, constitui um modelo perfeito de como os avanços clínicos e biotecnológicos se complementam.

Se bem que a etiologia da anemia dos doentes com insuficiência renal crónica (IRC) em terapêutica substitutiva da função renal seja multifactorial<sup>11</sup>, o deficit de produção de Eritropoietina constitui a causa *major*<sup>11-15</sup>. A aquisição da Eritropoietina humana por recombinação genética (rhEPO), tornou possível a sua produção em quantidades suficientes para aplicação clínica, o que permitiu a disponibilização de um meio comprovadamente eficaz para a correcção da anemia da IRC<sup>2,16-19</sup>.

Contudo a rápida correcção da anemia com a rhEPO, pelo aumento da eritropoiese, — condiciona um aumento considerável das necessidades em ferro, para a síntese de novo heme. A produção eritrocitária aumentada leva a uma utilização rápida das reservas de ferro do organismo e, se os depósitos disponíveis não forem suficientes, compromete uma resposta óptima à terapêutica com rhEPO, necessitando alguns doentes de suplementos de ferro oral ou intravenoso<sup>16-18,20-23</sup>.

Propusemo-nos analisar prospectivamente a evolução dos dados laboratoriais, não invasivos, que se correlacionam habitualmente com as reservas de ferro do organismo, no sentido de avaliar e, se possível, prever as situações de deficit ou de excesso de ferro, tentando deste modo obter orientações terapêuticas no que respeita à necessidade de suplementação. Estudámos 10 doentes com IRC em hemodiálise iterativa (HD), durante os primeiros 12 meses de tratamento com rhEPO para correcção da anemia.

## DOENTES E MÉTODOS

Participando num estudo europeu multicêntrico fomos estudar 10 doentes com IRC em programa de hemodiálise iterativa (3 sessões semanais), com idades compreendidas entre 32 e 72 anos (X=49), sendo 8 do sexo feminino e 2 do sexo masculino. O tempo médio de permanência em HD era de 44.2 ± 25.0 meses.

A etiologia da IRC na população estudada consistiu em: Glomerulonefrite Crónica 3 doentes, Nefropatia Tubulointerstitial Crónica 2, Hipertensão Arterial 2, Diabetes Mellitus 1, Síndrome de Alport 1 e desconhecida noutro caso.

Os doentes foram seleccionados para entrar no protocolo, pelos seguintes critérios: 1 — adultos (>18 anos), 2 — em programa de HD regular por um período de tempo de pelo menos 6 meses, 3 — anemia relacionada com IRC caracterizada por Hemoglobina (Hb) <9.0gr/dl e ou Hematócrito (Hct) <28%, ou anemia dependente de transfusões com mais de 3 transfusões nos últimos seis meses, ou Ferritina >700ng/ml.

Foram considerados critérios de exclusão; septicémia, infecção aguda, carência em ferro não corrigida, tratamento com citostáticos, preparações hormonais (excluindo anovulatórios e insulina) ou com imunodepressores, neoplasias malignas, hipertensão arterial mal controlada, epilepsia, síndrome hemolítica urémica, trombocitose, hepatite aguda, gravidez, deficit em ácido fólico e ou vitamina B12.

Os doentes apresentavam no início do estudo valores médios de Hb 7.36 ± 1.29gr/dl [5.8-9.6], Hct 22.6 ± 4.0% [18.0-29.8], ferritina 695.4 ± 276.0ng/ml [247-1000], siderémia 160.3 ± 49.5 µg/dl [99-247] e saturação da transferrina 55.3 ± 12.6% [40.1-72.3]. O número médio de transfusões nos 12 meses prévios ao início da terapêutica com rhEPO foi de 10.9 ± 3.2.

Todos os doentes deram o seu consentimento prévio, obtido por escrito, após uma informação sobre a natureza e o significado do estudo em causa. O ensaio desenvolveu-se segundo as normas da Declaração de Helsínquia (1964), revistas pelo acordo de Veneza (1983) e segundo as leis em vigor.

O estudo foi dividido em 3 períodos: o Período Pré-tratamento com Eritropoietina (Pré-rhEPO) que constou dos 14 dias que antecederam a terapêutica com rhEPO; o Período de Correcção da anemia (P. Correcção), variável para todos os doentes e que correspondeu ao intervalo de tempo entre o início da terapêutica com rhEPO e a data em que foram atingidos os valores de Hb e Hct pretendidos (Hb >10 <11 gr/dl ou Hct >30 <35%), estabilizados durante pelo menos 14 dias e com o doente não dependente de transfusões; o Período de Manutenção (P. Manutenção) constou do tempo decorrido após os valores de Hb e Hct pretendidos terem sido atingidos e estabilizados com doses inferiores de rhEPO.

A dose de rhEPO durante o P. Correcção foi uniforme de 80U/kg de peso, 3 vezes por semana, endovenosa, ministrada após a sessão de HD, até se atingirem os valores definidos como objectivo, passando-se depois ao P. Manutenção em que se reduziu para 30U/kg, 3 vezes por semana. Posteriormente esta dose foi corrigida de acordo com a Hb e o Hct determinados.

Foi realizado a todos os doentes um teste cutâneo de alergia, *in vivo*, com injeção de 0.2ml de uma diluição prévia (20 U) de rhEPO intradérmica num dos braços e de placebo, no braço contralateral.

A avaliação laboratorial incluiu entre outras as seguintes determinações: A-Pré HD, em todas as sessões (3 vezes por semana) no Pré-rhEPO e P. Correcção, e semanalmente no P. MANUTENÇÃO: Hb, Hct, volume globular médio (VGM), contagem de eritrócitos e reticulócitos; B — Pré HD, semanalmente no Pré-rhEPO, de 2 em 2 semanas no P. Correcção e de 4 em 4 semanas no P. Manutenção: ferritina, siderémia, transferrina, bilirrubinas, desidrogenase láctica (LDH), e haptoglobina; C-Pré-rhEPO, de 8 em 8 semanas no P. Correcção e P. Manutenção: pesquisa de anticorpos anti-rhEPO; D-Pré-rhEPO: ácido fólico e Vitamina B12. A percentagem de reticulócitos foi corrigida para o hematócrito (índice Reticulocitário), segundo fórmula descrita<sup>24</sup>.

Foi realizado a todos os doentes, antes do início do ensaio, o teste da Desferroxamina para excluir sobrecarga aluminica, com minitração do fármaco na dose de 20mg/kg de peso corporal e colheita de amostras de sangue para doseamento de alumínio pré e às 44 horas pós Desferroxamina.

A avaliação dos depósitos e do consumo de ferro no decurso da terapêutica com rhEPO foi feita com base nas determinações de ferritina, siderémica, transferrina e saturação da transferrina. Segundo um método previamente descrito, estimámos as Reservas Disponíveis em Ferro baseando-nos nos valores de ferritina, segundo a seguinte fórmula<sup>20,25</sup>: Reservas Disponíveis em Ferro = 400x(log ferritina - log 30) em que log é o logaritmo de base 10 e ferritina corresponde ao valor de ferritina do Pré-rhEPO, expresso em µg/l e 30 representa o valor mínimo de ferritina a partir do qual se consideraria que o doente entrasse em carência absoluta de ferro.

As Necessidades Calculadas em Ferro, para corrigir a Hb para os valores pretendidos, foram calculadas segundo a fórmula: Necessidades Calculadas em Ferro = 150x(10.5-Hbi) (mg) sendo 10.5gr/dl o valor pretendido no final do P. Correcção e Hbi a determinação do Pré-rhEPO para esse doente.

Considera-se o Balanço Previsto de Ferro a diferença entre as reservas disponíveis e as necessidades. O Balanço Previsto é considerado positivo caso as reservas excedam as necessidades e negativo no caso inverso.

Após a correcção da anemia os doentes foram divididos em 2 grupos: Grupo I (GI) — doentes que durante o período estudado apresentaram parâmetros laboratoriais compatíveis

QUADRO 1 – Variação dos valores médios e respectivos desvios padrão de hemoglobina (Hb), índice reticulocitário (I. Reticul.), volume globular médio (VGM) e dose de rhEPO por sessão de hemodiálise, no Pré-rhEPO, Período de Correção. (P. cor), 3, 6 e 12 meses do Período de Manutenção, nos doentes dos Grupos GI e GII

	IGrupos	Pré-rhEPO	P. Cor	3 Meses	6 Meses	12 Meses
Hb (gr/dl)	GI	7,3 ±1,5	9,5* ±1,3	11,5* ±1,5	9,4* ±1,2	10,2* ±1,0
	GII	7,4 ±1,2	9,6* ±0,9	11,8 ±1,6	9,7* ±1,2	10,6* ±1,1
I. Reticul. %	GI	0,6 ±0,2	1,4* ±0,2	0,9 ±0,3	0,5 ±0,4	1,4* ±0,3
	GII	1,0 ±0,5	2,1* ±0,6	1,2 ±0,4	0,7 ±0,3	1,5* ±0,2
VGM (μ3)	GI	91,4 ±2,3	95,6* ±2,3	95,3 ±3,0	94,8 ±4,7	94,4 ±4,8
	GII	95,0 ±4,0	96,9* ±3,1	98,6 ±3,8	97,7 ±5,4	98,3 ±5,3
Dose rhEPO (U/Kg)	GI	0	80	40,0 ±22,4	44,0 ±25,1	42,0 ±13,0
	GII	0	80	27,0 ±6,7	26,2 ±21,8	36,4 ±14,3

\*  $p < 0.05$  vs Pré-rhEPO

com deficit de ferro, Grupo II (GII) – doentes em que nunca, durante o ensaio se verificou situação de deficit de ferro.

Foi definido Deficit de Ferro como, sempre que se verificasse, em qualquer momento do estudo, valores de saturação da transferrina  $< 16\%$  e ou ferritina  $< 30$  ng/l.

Os doentes iniciaram terapêutica de suplementação com sulfato ferroso, *per os*, quando a saturação da transferrina desceu para valores menores que  $16\%$ , ou quando a ferritina desceu para valores menores que  $200$  ng/ml. Nenhum doente fez tratamento com ferro profilaticamente. A nenhum doente foi ministrado ferro endovenoso.

Na análise estatística de variáveis contínuas dentro do mesmo grupo foi utilizada a Análise de Variância Múltipla (ANOVA) com correção de Bonferroni e entre grupos diferentes foi usado o  $\tau$  Teste.

Na análise de contingência foi utilizado teste de Fischer.

Foram considerados significativos valores de  $p < 0.05$ .

As determinações de hemoglobina, hematócrito, e volume globular médio foram efectuadas em sangue total, por método automático no aparelho Coulter Counter Model S. Plus IV. A contagem de reticulócitos foi efectuada em esfregaços corados de azul brilhante de cresil.

Os doseamentos de bilirrubina e desidrogenase láctica foram efectuados no multianalisador Hitachi 704. Para a bilirrubina foi utilizado o método de Jendrassik. Para a desidrogenase láctica foi usado o método cinético enzimático em UV. A haptoglobina foi determinada por método electroforético, medindo a capacidade de fixação.

As determinações de siderémia e transferrina foram efectuadas por método colorimétrico sem desproteinização (ferrozima).

O alumínio foi determinado por absorção atômica.

Os doseamentos de vitamina B12, ácido fólico e a pesquisa de anticorpos Anti-rhEPO foram efectuados por Radioimunoensaio. A ferritina foi determinada por método imunoradiométrico (IRMA).

## RESULTADOS

Durante o período de estudo nos doentes protocolados, não houve nenhuma morte, nem nenhum doente necessitou de abandonar a terapêutica. Um dos doentes, 6 semanas após o início de rhEPO, foi vítima de acidente de viação com perdas hemáticas significativas (descida aguda do valor de Hb de  $1.6$  gr/dl), sem ter necessitado contudo de terapêutica transfusional.

As populações nos dois grupos estudados, GI (com Deficit de Ferro) e GII (sem Deficit de Ferro) são idênticas em idade, distribuição por sexos, tempo de permanência em HD, valores médios de hemoglobina prévios à terapêutica com rhEPO e necessidades transfusionais.

No Pré-rhEPO, todos os doentes apresentavam valores dentro ou acima dos limites considerados habitualmente normais (Ácido Fólico: GI= $25.7 \pm 5.6$ ; GII= $21.3-3.4$   $\mu$ g/ml –  $p=n.s.$ ) (Vitamina B12: GI= $2600-564$ ; GII= $2143 \pm 380$  pg/ml –  $p=n.s.$ )

### Resposta à terapêutica com eritropoietina recombinante

No total da população estudada verificou-se um aumento significativo dos valores de Hb ( $p < 0.005$ ), no P. Correção e aos 3, 6 e 12 meses do P. Manutenção, em relação aos valores do Pré-rhEPO. Observou-se uma subida significativa do índice reticulocitário ( $p < 0.05$ ) no P. Correção, regressando a níveis próximos dos iniciais aos 3 e 6 meses, verificando-se uma nova subida aos 12 meses de terapêutica ( $p < 0.05$ ).

O pico máximo de reticulócitos verificou-se durante o P. Correção aos  $14.4 \pm 5.1$  dias. O aumento de Hb de  $10\%$  em relação ao valor basal atingiu-se aos  $12.0 \pm 3.2$  dias e a subida de  $10\%$  de Hct verificou-se aos  $23.0 \pm 16.4$  dias.

Analisando a evolução nos dois Grupos de doentes verifica-se que, em todas as observações, em GI e GII houve sempre um aumento significativo dos valores de Hb, em relação ao Pré-rhEPO ( $p < 0.05$ ), não se tendo observado diferenças comparativamente aos dois Grupos (Quadro 1). O índice reticulocitário subiu significativamente quer em GI quer em GII no P. Correção, descendo para níveis próximos dos valores basais aos 3 e 6 meses, observando-se novo aumento aos 12 meses. Não se verificaram nunca diferenças significativas entre os dois Grupos (Quadro 1).

O P. Correção apresentou na população estudada uma duração média de  $46.7 \pm 18.6$  [30-61] ( $p=n.s.$ ).

Apesar de o volume globular médio ser mais elevado em todas as determinações do período estudado sob terapêutica com rhEPO, do que na basal, este aumento só foi significativo no P. Correção ( $p < 0.05$ ), tendo-se registado uma maior dispersão dos valores aos 3, 6 e 12 meses. Não se observaram diferenças significativas entre GI e GII (Quadro 2).

Se bem que as doses de rhEPO ao longo de todo o P. Manutenção fossem sempre mais elevadas em GI que em GII, estas diferenças nunca estatisticamente significativas (Quadro 1).

QUADRO 2 – Evolução dos valores de saturação da transferrina no Pré-rhEPO, durante o Período de Correção (P. Cor.), 3, 6 e 12 meses de terapêutica com rhEPO, nos doentes dos Grupos GI e GII

Grupo	Doentes	Saturação transferrina (%)				
		Pré-rhEPO	P. Cor.	3 Meses	6 Meses	12 Meses
GI	1	70,0	29,1	15,0	22,2	21,3
	2	50,5	37,3	14,9	22,2	20,8
	3	53,1	22,7	13,8	11,5	16,0
	4	40,1	28,3	14,8	23,4	27,6
	5	41,4	21,6	14,0	14,3	20,7
X		51,0	27,8*	14,5*	18,7*	21,3*
SD		12,0	6,3***	0,6**	5,4***	4,1**
GII	6	66,7	37,5	69,5	56,8	48,1
	7	65,4	42,5	70,2	76,5	64,0
	8	53,2	44,6	52,7	39,9	43,2
	9	72,3	28,6	37,0	19,2	40,0
	10	40,3	40,3	25,5	28,4	28,1
X		59,6	38,7	51,0	44,2	44,7
SD		12,8	6,2***	19,8**	22,9***	13,1**

\* p<0.05 vs Pré-rhEPO; \*\* p<0,01 GI vs GII; \*\*\* p<0,05 GI vs GII

Após o início de rhEPO nenhum doente teve necessidade de terapêutica transfusional, durante o período estudado.

Não encontramos evidência de hemólise baseado nos valores de bilirrubinas, desidrogenase láctica e haptoglobina.

A pesquisa de anticorpos Anti-rhEPO foi negativa em todos os doentes.

**Avaliação das reservas e necessidades de ferro**

Em simultâneo com a subida dos valores de hemoglobina observou-se, em GI, uma descida dos valores da siderémia, no P. Correção, aos 3, 6 e 12 meses, relativamente ao Pré-rhEPO (p<0.05), tendo o valor mínimo sido observada aos 3 meses. No GII, a redução dos valores da siderémia só foi significativa em relação ao valor basal, no P. Correção e aos 6 meses (p<0.05) (fig. 1). Apesar de ambos os grupos apresentarem valores semelhantes de siderémia no Pré-rhEPO, no restante período de estudo o ferro sérico foi sempre significativamente inferior em GI do que em GII (p<0.05) (fig. 1). No que respeita à transferrina não se verificaram alterações quer ao longo de todo o período protocolado, quer entre os doentes dos dois Grupos.

A saturação da transferrina desceu significativamente nos doentes do Grupo I (GI), no P. Correção, 3, 6 e 12 meses (p<0.005), observando-se os valores mínimos aos 3 meses (Quadro 2) (fig. 2). Verificaram-se valores de saturação de transferrina <16% em todos os doentes deste Grupo aos 3 meses (doentes 1 a 5) e nos doentes 3 e 5 também aos 6 meses. O doente 3 apresentava, ainda aos 12 meses, saturação da transferrina=16%. Em GII, a saturação da transferrina não sofreu variações significativas e nenhum doente durante o período de estudo apresentou determinações <16% (Quadro 2) (fig. 2). Analisando os dois Grupos comparativamente verifica-se que no Pré-rhEPO não havia qualquer diferença significativa entre GI e GII. Já no P. Correção e em todos os tempos de observação seguintes a saturação da transferrina em, GI foi sempre significativamente inferior a GII (Quadro 2) (fig. 2).

Os valores de ferritina em GI têm uma redução que só é significativa aos 3 meses e nos restantes períodos, em relação aos valores do Pré-rhEPO (p<0.05). Os valores mais baixos foram observados aos 3 meses. Em GII não se verificaram alterações significativas de ferritina (Quadro 3) (fig. 3). No Pré-rhEPO e em todos os tempos de observação seguintes, observaram-se sempre valores de ferritina em GI significativamente inferiores a GII. Analisando os valores do Pré-rhEPO observa-se que todos os doentes do GII apresentavam níveis basais de ferritina >700ng/

/ml (Quadro 3). Em nenhum doente, quer de GI, quer de GII, se verificou, em qualquer dos momentos analisados, valores de ferritina <30ng/ml, tendo-se apenas observado no doente 4 aos 3 meses e doente 5 aos 3 e 6 meses níveis de ferritina <100ng/ml (Quadro 3).

Avaliando as Reservas Disponíveis em Ferro e as Necessidades do mesmo, segundo as fórmulas definidas, verifica-se que dos 5 doentes com Balanço Previsto de Ferro negativo (doentes 1, 2, 3, 4, 10), 4 desenvolveram efectivamente Deficit de Ferro (incluídos em GI) (Quadro 4), e 1 (doente 10) permaneceu até ao fim do estudo sem entrar em carência de ferro, tendo portanto sido incluído no GII. Dos 5 doentes que tinham um Balanço Previsto de Ferro positivo (doentes 5, 6, 7, 8, 9) (Quadro 4), em 4 não se verificou Deficit de Ferro. Um doente (doente 5) foi excluído desta fase do estudo por perdas hemáticas.

Encontra-se uma correlação entre o Balanço Previsto de Ferro, calculado no início do estudo e o desenvolvimento ou não de sinais de Deficit de Ferro ao longo do ensaio (p<0.05).

Assim baseados nos cálculos das Reservas Disponíveis em Ferro e das Necessidades Calculadas em Ferro, estimadas antes do início da terapêutica com rhEPO, foi possível prever quais os

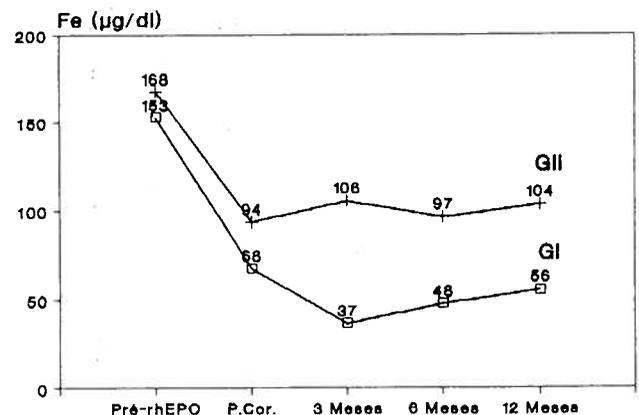


Fig. 1 – Variação dos valores médios da siderémia no Pré-rhEPO, Período de Correção (P. Cor.) e aos 3, 6 e 12 meses, nos doentes dos Grupos GI e GII. (p<0.05 GI: Pré-rhEPO vs todas restantes determinações) (p<0,05 GII: Pré-rhEPO vs P. Cor.; Pré-rhEPO vs 6 Meses) (p<0.05 GI vs GII no P. Cor., 3 Meses e 12 Meses).

QUADRO 3 – Evolução dos valores de ferritina no Pré-rhEPO, durante o Período de Correção (P. Cor.), 3, 6 e 12 meses de terapêutica com rhEPO, nos doentes dos Grupos GI e GII

Grupo	Doentes	Ferritina (ng/ml)				
		Pré-rhEPO	P. Cor.	3 Meses	6 Meses	12 Meses
GI	1	257	247	152	127	137
	2	545	552	419	545	420
	3	866	556	626	465	416
	4	368	195	62	127	139
	5	420	150	33	87	210
X		489,2	340,0	258,4*	270,2*	264,4*
SD		236,2**	198,4**	255,8***	216,8**	143,3**
GII	6	869	483	779	318	802
	7	865	1000	998	736	866
	8	776	1000	879	1000	1000
	9	998	838	536	669	724
	10	1000	720	354	682	682
X		901,6	808,2	709,2	681,0	814,8
SD		96,4**	216,8**	261,4***	243,3***	125,5**

\*  $p < 0,05$  vs Pré-rhEPO; \*\*  $p < 0,01$  GI vs GII; \*\*\*  $p < 0,05$  GI vs GII

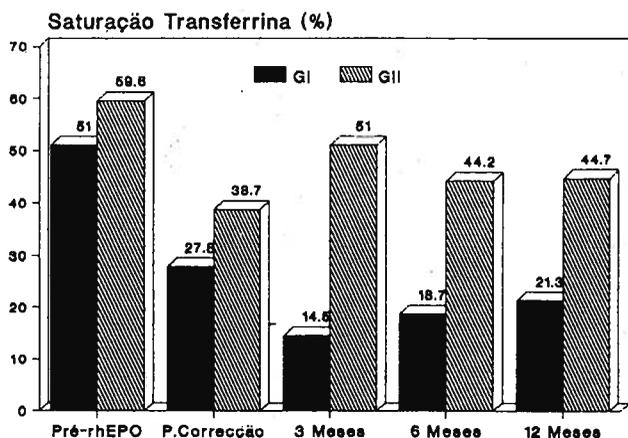


Fig. 2 – Valores médios de saturação da transferrina no Pré-rhEPO, Período de Correção e aos 3, 6 e 12 meses, nos doentes do Grupo GI e GII. ( $p < 0,05$  GI: Pré-rhEPO vs todas restantes determinações) ( $p < 0,05$  GI vs GII P. Correção, 3, 6 e 12 Meses).

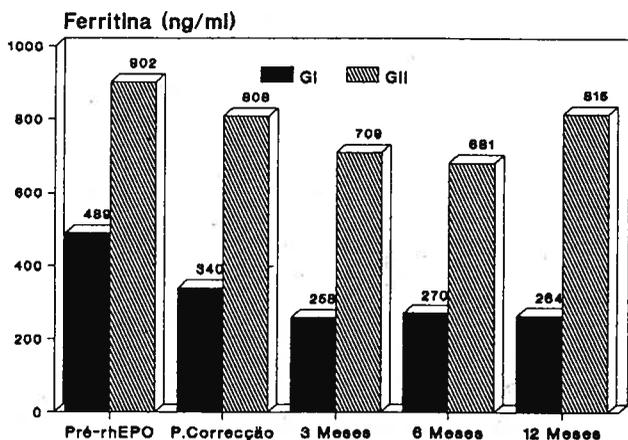


Fig. 3 – Valores médios de ferritina no Pré-rhEPO, Período de Correção e aos 3, 6, 12 meses, nos doentes dos Grupos GI e GII. ( $p < 0,05$  GI: Pré-rhEPO vs 3 Meses; Pré-rhEPO vs 6 Meses; Pré-rhEPO vs 12 Meses) ( $p < 0,05$  GI vs GII no Pré rhEPO, P. Correção, 3, 6 e 12 Meses).

doentes em que se iria desenvolver Déficit de Ferro com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 80%.

Analisando os dois Grupos, GI e GII, verifica-se que estes não eram significativamente diferentes no que respeita às Necessidades Calculadas em Ferro, sendo contudo as Reservas Disponíveis em Ferro significativamente inferiores em GI do que em GII ( $p < 0,05$ ) (Quadro 4).

Todos os doentes do Grupo I fizeram terapêutica com sulfato ferroso, *per os*. Esta foi iniciada aos 3 meses nos doentes 1, 2 e 3 quando os valores de saturação da transferrina desceram abaixo de 16% (Quadro 2). Os doentes 4 e 5 iniciaram suplementação de ferro mais cedo, durante o P. Correção, por apresentarem valores de ferritina  $< 200$ ng/ml. Uma vez iniciada, a terapêutica com sulfato ferroso foi continuada durante o restante período de estudo, tendo as doses variado entre os 525 e 1075 mg por dia, com o objectivo de manter a taxa de saturação da transferrina superior a 20% e os valores de ferritina superiores a 200ng/ml.

QUADRO 4 – Valores de Reservas Disponíveis em Ferro no início do estudo, Necessidades Calculadas em Ferro para corrigir a hemoglobina para o valor de 10,5gr/dl e do Balanço Previsto de Ferro no final do Período de Correção, nos doentes em que se verificou Déficit de Ferro durante o período de estudo (GI) e nos que não se observou Déficit de Ferro (GII).

Grupo	Doentes	Reservas Fe (mg)	Necessidades De Fe (mg)	Balanço Previsto de Fe (mg)
GI	1	366,2	375	-8,8
	2	503,7	555	-51,3
	3	584,2	705	-120,8
	4	435,5	600	-164,5
	5	458,5	135	+323,5
X		469,6*	474,0#	
SD		81,1	223,9	
GII	6	584,8	405	+179,8
	7	584,0	345	+239,0
	8	565,1	270	+295,1
	9	608,8	600	+8,8
	10	609,2	705	-95,8
X		588,8*	465,0#	
SD		17,0	181,6	

\*  $p < 0,05$  GI/GII; #  $P = n.s.$

## DISCUSSÃO

A aquisição da Eritropoietina Humana obtida por recombinação genética permitiu passarmos a dispor de um meio eficaz para corrigir a anemia da insuficiência renal crônica nos doentes em hemodiálise, tal como foi demonstrado nos primeiros ensaios humanos com a utilização de rhEPO<sup>16-19</sup>.

Também cedo, se verificou que os depósitos em ferro do organismo eram rapidamente utilizados para a síntese de nova hemoglobina, devido ao marcado aumento da eritropoiese induzido. A deficiência em ferro constitui assim uma ocorrência frequente durante a terapêutica com Eritropoietina, necessitando alguns doentes de suplementos de ferro para manter o nível adequado de produção eritrocitária<sup>16-18, 20-23</sup>. Foi demonstrado, por alguns autores, que sob esta forma de terapêutica se verificava alguns doentes, uma situação de deficit funcional em ferro caracterizada por: aparecimento de saturação da transferrina <20%, eventualmente acompanhada de suspensão da subida da hemoglobina e regressão da contagem de reticulócitos previamente elevados, persistindo a ferritina dentro dos valores considerados normais ou mesmo acima do normal<sup>17,22,23</sup>. Esta ocorrência deve-se ao facto de, como resposta à rhEPO, se verificar um aumento marcado da eritropoiese. Isto, por sua vez, faz com que as necessidades aumentadas em ferro para a síntese de novas moléculas de hemoglobina possam exceder a capacidade do Sistema Reticulo-Endotelial em libertar o ferro para a circulação para ser liado à transferrina<sup>17</sup>. Em alguns doentes foi ainda referida a ocorrência de deficiência absoluta em Fe manifesta pelos critérios acima referidos, mas acrescida da descida dos valores de ferritina para níveis inferiores ao normal<sup>17</sup>.

No nosso estudo também encontramos como resposta à terapêutica com rhEPO, uma subida significativa dos valores da hemoglobina e do hematócrito para os níveis pretendidos, assim como fim da necessidade de transfusões no período estudado.

O aumento do índice reticulocitário, nos períodos em que a dose de rhEPO ministrada era maior também traduz o aumento da eritropoiese induzida nesses períodos.

Dos 10 doentes estudados, 5 desenvolveram Deficit de Ferro, pelo que foram incluídos no Grupo I (GI). O critério verificado para se considerar Deficit de Ferro foi nos 5 doentes o de terem ocorrido durante o estudo valores de saturação da transferrina inferiores a 16% e, em nenhum caso, o de os valores de ferritina terem descido, em qualquer momento do ensaio, abaixo do limite de 30ng/ml (Quadros 2 e 3). Observamos assim, que em todos os casos em que ocorreu deficiência de ferro, esta era por deficit funcional de ferro e em nenhum caso por deficit absoluto de ferro. Contudo, em 2 casos (doentes 5 e 6) (Quadro 3), verificou-se uma redução dos valores da ferritina, aos 3 meses, para níveis <100ng/ml (62 e 33ng/ml, respectivamente), que ulteriormente voltaram a subir para valores superiores a 100ng/ml, eventualmente por se encontrarem já sob terapêutica de suplementação com ferro, oral.

A par da subida da hemoglobina verificou-se uma descida dos valores da saturação da transferrina e da ferritina, que só foram evidentes nos doentes que vieram a desenvolver Deficit em Ferro, ou seja do Grupo GI (fig.2 e 3) (Quadros 2 e 3). Enquanto que nestes doentes (GI) a saturação da transferrina começou a descer ainda durante o Período de Correção da anemia, a ferritina só começou a descer aos 3 meses, quando todos os doentes já se encontravam em Deficit de Ferro, pelo critério acima mencionado. A saturação da transferrina comportou-se assim como um parâmetro mais precoce e mais sensível para detectar esta situação, do que o doseamento da ferritina. Contudo a siderémia interpretada isoladamente não se revelou um parâmetro tão sensível para avaliar a carência em ferro.

Apesar de a diferença na dose de rhEPO entre o Grupo de doentes que desenvolveram Deficit de Ferro (GI) e o que não desenvolveu (GII), não ter significado estatístico, pela grande dispersão de resultados, o facto de, os valores médios durante o Período de Manutenção terem sido sempre superiores no Grupo com Deficit com Deficit de Ferro (Quadro 1), pode traduzir uma

tendência para aumentar as doses de rhEPO, devido a uma resposta subótima à terapêutica, uma vez que nesta fase do estudo, o critério de acerto da dose era baseado exclusivamente na manutenção dos valores de Hb e Hct dentro dos limites previamente estabelecidos.

O facto de a deficiência de ferro durante a terapêutica com rhEPO ser uma ocorrência frequente e poder de algum modo comprometer a resposta ideal à terapêutica com rhEPO, também mencionado por outros autores<sup>16, 17, 23</sup> (ocasionando eventualmente que as doses de rhEPO sejam indevidamente aumentadas), realça a importância de se conseguir uma adequada avaliação dos depósitos em ferro e da previsão das necessidades calculadas antes de se corrigir a anemia.

A avaliação precisa dos depósitos em ferro nos doentes com insuficiência renal crônica, em hemodiálise, é bastante difícil pelas alterações da produção e da destruição de eritrócitos, transfusões sanguíneas, doenças intercorrentes e perdas hemáticas de múltiplas etiologias, presentes nestes doentes e que tomam o balanço externo e interno relativamente instável<sup>25</sup>. Existe uma correlação positiva entre os níveis séricos de ferritina e os depósitos teciduais do organismo. Contudo estes valores sofrem variações normais com a idade e o sexo, que devem ser tomadas em consideração sempre que estejam sendo interpretados valores de um doente específico. Tem-se discutido, se os valores da ferritina são um parâmetro digno de confiança para avaliar os depósitos em ferro nos doentes com insuficiência renal crônica em HD. Trabalhos recentes têm demonstrado que a ferritina pode ser um bom marcador dos depósitos de ferro neste tipo de doentes e que essa relação se encontra mantida nos doentes em tratamento com Eritropoietina<sup>23,26,27</sup>, desde que não esteja presente qualquer infecção, inflamação marcada, neoplasia, ou doença hepática, situações que podem fazer subir os níveis de ferritina sérica<sup>17,23</sup>.

Com base nos cálculos Pré-rhEPO foi possível de algum modo prever quais os doentes que iriam entrar em Deficit de Ferro e assim obter orientações prévias para a necessidade de introdução de suplementos de ferro. No único doente que apresentava no início do estudo um Balanço de Ferro previsto negativo e que nunca desenvolveu deficit de ferro (doente 10 - Quadro 4), verificava-se um valor de ferritina Pré-rhEPO de 1000ng/ml (Quadro 3). Apesar dos sinais de sobrecarga em ferro, este doente tinha um Balanço Previsto negativo em virtude das enormes Necessidades Calculadas, partindo de valores médios de Hb no Pré-rhEPO de 5.8gr/dl, dependente de transfusões. Estudos prévios referem que a correlação linear entre o logaritmo da ferritina e os depósitos de ferro, que serviu de base aos nossos cálculos, deixa de ser para valores altos de ferritina nomeadamente acima dos 1000ng/ml, a partir dos quais as estimativas das reservas em ferro do organismo são mais qualitativas que quantitativas. O que aconteceu no doente referido é que ao apresentar um valor de ferritina Pré-rhEPO de 1000ng/ml, os seus depósitos de ferro foram eventualmente subestimados, pelas razões apontadas, não tendo assim esgotado as reservas de ferro. Este facto está de acordo com dados já previamente assinalados por outros autores, que referem que a quantificação dos depósitos em ferro, acima de 1000ng/ml de ferritina é pouco importante, uma vez que o risco de estes doentes desenvolverem carência em ferro é bastante reduzido<sup>17,20</sup>. Por sua vez todos os doentes que desenvolveram Deficit de Ferro apresentavam, no início do estudo, um Balanço Previsto de Ferro negativo, verificando-se assim uma grande sensibilidade do teste em detectar situações de futura necessidade de terapêutica com ferro. Isto evidentemente se excluirmos o doente 5 (Quadro 4), pelas razões já referidas, que além de ter apresentado perdas hemáticas às 6 semanas de tratamento, quando já se encontrava no P. Manutenção, teve que recuperar da anemia, com novo aumento da dose de rhEPO e portanto da eritropoiese, com maior consumo de ferro, com as consequentes alterações do balanço externo e mesmo interno de ferro.

No nosso estudo, em todos os doentes que não desenvolveram Deficit de Ferro (GII), os valores de ferritina sérica Pré-rhEPO eram superiores a 700ng/ml (Quadro 3), enquanto que os doentes do Grupo oposto tinham valores de ferritina significativamente inferiores, havendo contudo um doente que apresentava determinações acima de 700ng/ml (866 ng/ml) (doente 3 - Quadro 3).

Concluimos que mesmo com valores iniciais de ferritina superiores ao normal é possível desenvolver Deficit em Ferro, alguns meses após o início de terapêutica com rhEPO. É possível prever o aparecimento de Deficit de Ferro, avaliando as Reservas Disponíveis em Ferro no início da terapêutica e as suas Necessidades Previstas para a correcção da anemia, com base, apenas, em parâmetros laboratoriais não invasivos. A taxa de saturação da transferrina foi o parâmetro mais sensível e mais precoce para avaliar o deficit funcional em ferro. Sugere-se a monitorização apertada da saturação da transferrina e da ferritina durante a terapêutica com rhEPO para correcção da anemia da insuficiência renal crónica, assim como a profilaxia com suplementação de ferro a todos os doentes com valores basais de ferritina sérica menores que 500ng/ml. Por sua vez nos doentes com valores de ferritina superiores a 1000ng/ml o risco de virem a desenvolver qualquer tipo de deficiência em ferro, é mínimo.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Dr. Ernestina Lima e Dr. Elizabeth Melo Gomes a importante colaboração na orientação e execução do protocolo analítico. Agradecemos à Boehringer Mannheim, pela disponibilização da Eritropoietina Humana obtida por Recombinação Genética.

#### BIBLIOGRAFIA

- JOURDANET D.: De l'anémie des altitudes et de l'anémie en general das ces rapports avec la pression de l'atmosphère. Paris, Bailliere, 1863.
- ERSLEV A.: Erythropoietin coming of age. Editorial. *N Eng J Med* 1987; 316: 101-3
- BRIGHT R.: Cases and observations illustrative of renal disease accompanied with the secretion of albuminous urine. *Guy Hospital Rep* 1836; 1: 340-342
- ERSLEV A.J.: Humoral regulation of red cell production *Blood* 1953; 8: 349-57.
- JACOBSON L.O., GOLWASSER E., TRIED N, BLZAK L.F.: Role of the Kidney in erythropoietin. *Amer J Med* 1975; 58: 25-30
- GOLDWASSER E., WHITE W.F., TAYLOR K.B.: Further purification of sheep plasma erythropoietin. *Biochim Biophys Acta* 64; 1982: 487.
- MIYAKE T., KUNG CK., GOLWASSER E.: Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-64.
- JACOBS K., SHOEMAKER C., RÜDERSDORF R., NEIL S.D., KAUFMAN, R.J., MUFSON A., SEEHRA J, JONES S.S., HEWICK R., FRITSCH E F., KAWAKITA M., SCHIMIZU T., MIYAKE T.: Isolation and characterization of genomic cDNA clones of human erythropoietin. *J Biol Chem* 1977; 252: 5558-64.
- LINF.K. SUGGS S, LIN C.H. BROWNE J.K., SMALLING R. EGRIE J.C. CHEN K.K., FOX G.M., MARTIN F, STABINSKY Z, BADRAWI S.M. LAIP.H., GOLWASSER E.: Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natn Acad Sci*; 82: 7580.
- ESCHBACH J.W. ADMASON J.W.: Anemia of end stage renal disease. Editorial review. *Kid Int* 1985; 28: 1-5.
- ADMASON J.W., ESCHBACH J.W., FINCH C.A.: The kidney and erythropoiesis. *Amer J Med* 1968; 44: 725-33.
- McGONIGLE R.J.S., WALLIN J.D., SHADDUCK R.K., FISHER J.W.: Erythropoietin in renal insufficiency. *Kid Int* 1984; 25: 437-44.
- GARCIA J.F. EBRE S.N. HOLLANDER L. CUTTINGH.O., MILLER M.E., CRONKITE E.P., Radioimmunoassay of erythropoietin: Circulating levels in normal and polycythemic human beings. *J Lab Clin Med* 1982; 99: 624-35.
- DELWICHE F, GARRITY M.J. POWELL J.S., ROBERTSON R.P., ADMASON J.W.: High levels of the circulating form of parathyroid hormone do not inhibit *in vitro* erythropoiesis. *J Lab Clin* 1983; 102: 613-20.
- WINEARLS C.: Erythropoietin - advent of a new treatment. *The practitioner* 1987; 231: 1296-73.
- ESCHBACH J.W. EGRIE J.C., DOWNING M.R., BOWIE J.K., ADMASON J.W.: Correction of the anemia of end stage renal disease with recombinant human erythropoietin: results of a combined phase I and II clinical trial. *N Engl J Med* 1987; 316: 73-8.
- WINEARLS C.G., OLIVER D.O., PIPPARD M.J., REID C., DOWNING M.R., OTES P.M.: Effect of human erythropoietin derived from recombinant DNA on the anemia of patients maintained by chronic hemodialysis. *Lancet* 1986; II: 1175-8.
- BOMMER J., ALEXIOU C, MULLER-BUHL U, EIFERT J., RITZE.: Recombinant human erythropoietin therapy in hemodialysis patients - dose determination and clinical experience. *Nephrol Dial Transplant* 1987; 2: 238-42.
- VAN WICK D.B. STIVELMAN J.C., RUIZ J, KIRLIN L.A. KATZ M.A., OGDEN D.A.: Iron status in patients receiving erythropoietin for dialysis-associated anemia. *Kid Int* 1989; 35: 712-6.
- MOHINIR.: Clinical efficacy of recombinant human erythropoietin in hemodialysis patient. *Semin Nephrol* 1989; 9: 16-21.
- GRUTZMACHER P., BERGMANN T., WEINREICH M., NATERMANN U., REIMERS E., PLOK M.: Beneficial and adverse effects of correction of anemia by recombinant human erythropoietin in patients on maintenance hemodialysis. *Contr Nephrol* 1988; 66: 104-13.
- ESCHBACH J.W.: The anemia of chronic renal failure: Pathophysiology and the effects of recombinant erythropoietin. *Nephrology Froum Kid Int* 1989 35: 134-48.
- COOK J.D., SKIKNE B.S., LYNCH S.R., REUSSER M.E.: Estimates of iron sufficiency in the US population. *Blood* 1986; 68: 726-31.
- MOREB J., POPOVTZER M.M., FRIENDLANDER M.M., KONJIN A.M., HERSHKO C.: Evaluation of iron status in patients on chronic hemodialysis: relative usefulness of bone marrow hemosiderin, serum ferritin, transferrin saturation, mean corpuscular volume and red cell protoporphyrin. *Nephron* 1983; 35: 196-200.
- ESCHBACH J., COOK J.D. SCRIBNER B.H., FINCH C.A.: Iron balance in hemodialysis patients. *Ann Intern Med* 87; 1977; 710-3.
- WATERS W., WELLNER U, BALDAMUS C.A., BRAMSIEPE P., SCHICHA H.: Effect of erythropoietin on iron kinetics in patients with end-stage renal disease. *Contr Nephrol* 66; 1988: 156-64.