



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**ÂNGELO MIGUEL CRISÓSTOMO CARVALHO**

***ANEMIA DA DOENÇA CRÓNICA NA  
INSUFICIÊNCIA CARDÍACA***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE GERIATRIA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSOR DOUTOR MANUEL TEIXEIRA MARQUES VERÍSSIMO**

**JANEIRO/2014**

**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**ANEMIA DA DOENÇA CRÓNICA  
NA INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

- Ângelo Miguel Crisóstomo Carvalho
- Mestrado Integrado em Medicina – 6ºano
- Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra
- Correspondência: [angelomcarvalho@hotmail.com](mailto:angelomcarvalho@hotmail.com)

**JANEIRO/2014**

## ÍNDICE

1. Lista de Abreviaturas .....	3
2. Resumo .....	4
3. Abstract .....	6
4. Introdução .....	8
5. Fisiopatologia da Anemia da Inflamação .....	10
5.1. Homeostasia do Ferro .....	10
5.2. Alterações na Regulação Sistémica de Ferro em Períodos Inflamatórios .....	16
6. Fisiopatologia da Anemia em Doentes com Insuficiência Cardíaca .....	20
6.1. Deficiente Produção de Eritropoietina.....	23
6.2. Resistência Medular à Eritropoietina Produzida .....	23
6.3. Papel da Inflamação.....	25
6.4. Papel da Hepsidina .....	26
6.5. Hemodiluição.....	28
6.6. Deficiência Absoluta de Ferro.....	29
7. Marcadores Prognóstico .....	30
7.1. Red Cell Distribution Width - RDW .....	32
7.2. Implicações Prognósticas da Presença de Anemia em Doentes Insuficientes Cardíacos.....	36
8. Diagnóstico .....	40
9. Tratamento .....	47
9.1. Transfusões Sanguíneas.....	47
9.2. Suplementação de Ferro.....	47
9.3. Agentes Estimulantes da Eritropoiese.....	50
9.4. Agentes Estimulantes da Eritropoiese associados a Suplementação de Ferro.....	52
9.5. Direcções Futuras Possíveis.....	53
10. Conclusão.....	55
11. Agradecimentos.....	57
12. Bibliografia.....	58

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**6MWD** - Distância Percorrida em 6 Minutos

**% HYPO** - Percentagem de Glóbulos Vermelhos Hipocrómicos

**ADC** - Anemia da Doença Crónica

**ADF** - Anemia por Deficiência de Ferro

**BNP** – Peptídeo Natriurético Cerebral

**BFU-E** - Unidades de Formação Explosivas de Eritróides

**BMP** - Proteína Morfogénica Óssea

**CHr** - Conteúdo reticulocitário de hemoglobina

**CFU-E** - Unidades Formadoras de Colónias Eritróides

**DMT1** - Transportador Divalente 1 de Metais

**EPO** - Eritropoietina

**GDF15** - Factor de Crescimento e Diferenciação 15

**HbSR** - Hemoglobin Scavenger Receptor

**IC** - Insuficiência Cardíaca

**IL** - Interleucina

**LPS** - Lipopolissacarídeo

**MHC I** - Complexo de Histocompatibilidade Humano I

**NYHA** - New York Heart Association

**RDW** - Coeficiente de Variação dos Eritrócitos

**sTfR** - Receptor de Transferrina Solúvel

**sTNFRI** – Receptor Solúvel de Factor de Necrose Tumoral

**TfR** - Receptor de Transferrina

**TIBC** – Capacidade de Fixação Total de Ferro

**TNF** - Factor de Necrose Tumoral

## RESUMO

A insuficiência cardíaca é uma das doenças mais prevalentes a nível mundial, especialmente no idoso, e apesar dos avanços médicos na prevenção de doenças cardiovasculares e nos arsenais terapêuticos, estima-se que a sua prevalência aumente em 50-75% até ao final de 2030 e o número de hospitalizações em 50% nos próximos 25 anos. Uma das suas complicações de maior importância e com significado prognóstico independente é o desenvolvimento de anemia. Os mecanismos através dos quais a anemia piora o prognóstico são desconhecidos mas podem estar relacionados com aumentos na pré-carga cardíaca. A patogenia da anemia no contexto de insuficiência cardíaca é multifactorial, com a conjugação de deficiente produção de eritropoietina ou resistência medular à sua acção, expressão aumentada de hepcidina ou hemodiluição; no entanto, evidências recentes sugerem que a anemia da inflamação possa ser a etiologia dominante e o mecanismo preferencial do desenvolvimento desta complicação. De facto, o ambiente pró-inflamatório que caracteriza a insuficiência cardíaca tem sido intensamente estudado, começando-se a delinear as alterações na regulação sistémica de ferro em períodos inflamatórios e as bases fisiopatológicas da anemia desenvolvida neste contexto. Tem ainda existido crescente reconhecimento dos efeitos inibitórios que a inflamação tem na produção de eritropoietina e na resposta que precursores eritróides exibem a esta hormona, bem como do conceito de deficiência funcional de ferro. Concomitantemente com o avanço no esclarecimento destes mecanismos, surgem novos marcadores com valor prognóstico que reflectem o seu impacto nestes doentes, nomeadamente o RDW.

A anemia da doença crónica apresenta assim importantes desafios diagnósticos à comunidade médica, nomeadamente no reconhecimento e diagnóstico diferencial desta entidade com anemia por deficiência de ferro através da interpretação dos parâmetros

hematológicos convencionais. Novos parâmetros, como o sTfR, o Índice de sTfR ou o CHr são importantes recursos ainda obliados e pouco disponíveis ou explorados na prática clínica diária, sendo de grande relevo o seu contínuo desenvolvimento e adopção das mais recentes considerações diagnósticas e mesmo terapêuticas que têm sido alcançadas. Se a anemia é um mediador e não apenas um marcador de mau prognóstico, a sua correcção pode tornar-se um novo e significativo alvo terapêutico na tentativa de melhorar a sobrevida a longo termo destes pacientes. Constante actualização neste tópicoo é essencial à boa prática clínica no seguimento de pacientes com insuficiência cardíaca ou outras doenças crónicas com importante componente inflamatório.

**Palavras-chave:** anemia da doença crónica, insuficiência cardíaca, inflamação, hepcidina, eritropoietina, ferro, RDW, prognóstico, tratamento.

## **ABSTRACT**

Heart failure is one of the most prevalent diseases worldwide, especially in the elderly, and despite medical advances in the prevention of cardiovascular diseases and therapeutic arsenals, it is estimated that its prevalence will increase by 50-75% until the end of 2030 and the number of hospitalizations by 50% over the next 25 years. One of the most important complications and a marker with independent prognostic significance is the development of anaemia. The mechanisms by which anemia worsens heart failure outcomes are unknown but may be related to increased myocardial workload. The pathogenesis of anaemia in the context of heart failure is multifactorial, with a combination of deficient production of erythropoietin or marrow resistance to its action, increased expression of hepcidin or hemodilution being implied, amongst others; however, recent evidence suggests that anaemia of inflammation may be the dominant etiology and the preferential mechanism for the development of such complication. Indeed, the pro-inflammatory environment that characterizes HF has been extensively studied, being the changes in the systemic regulation of iron in inflammatory periods and pathophysiological basis of anaemia, developed in this context, starting to become delineated. Recently there's been increasing recognition about the inhibitory effects that inflammation may exert on erythropoietin production and on the response levels that erythroid precursors show to this hormone's action. The concept of functional iron deficiency has also been increasingly acknowledged lately. Alongside the progress made on our understanding of these mechanisms, new markers of significant prognostic value that reflect its impact on these patients are arising, namely RDW.

The anaemia of chronic disease therefore presents important diagnostic challenges to all medical community, especially on the grounds of the recognition of this entity and its differential diagnosis with iron deficient anaemia, especially when

considering conventional haematological parameters. New diagnostic tools, like sTfR, sTfR Index or CHr are important resources still commonly obliviaded and sometimes unavailable or underexploited on daily clinical practice, being the continuous development and adoption of the newest diagnostic and therapeutical considerations that have been recently achieved, of major interest. If anemia is a mediator and not just a marker of poor outcomes, correcting anemia could become an important and novel therapeutic target to improve long-term outcomes in such patients. Therefore, constant updates on this matter is essential to a good medical conduct on the management of patients that develop HF or other conditions of marked inflammatory component.

**Keywords:** anaemia of chronic disease, heart failure, inflammation, hepcidin, erythropoietin, iron, RDW, prognostic, treatment.



## INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca é o desfecho comum da maioria das afecções cardíacas, representando a principal causa de morte no mundo ocidental, sendo expectável que a sua prevalência continue a aumentar dados o aumento da esperança média de vida das populações e a crescente eficácia da medicação administrada. A sua prevalência é de cerca de 2% da população total mundial e 15% entre os doentes com mais de 80 anos.<sup>1</sup> Apesar de se ter verificado um decréscimo na mortalidade anual de cerca de 8%, com o advento do uso de fármacos beta-bloqueantes e de antagonistas do sistema renina-angiotensina-aldosterona, esta permanece muito alta na prática clínica.<sup>2</sup> Uma razão para esta disparidade pode ser a exclusão dos ensaios clínicos de doentes com comorbilidades importantes que contribuam para altas taxas de mortalidade, sendo a anemia uma dessas comorbilidades e, de resto, um recente alvo terapêutico na abordagem de doentes insuficientes cardíacos.<sup>3</sup> De facto, estudos recentes indicam que os doentes com insuficiência cardíaca são frequentemente anémicos, e que a presença desta condição acarreta pior prognóstico.

Considera-se que a anemia está presente, de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, quando as concentrações de hemoglobina atingem valores inferiores a 13 g/dL nos homens e 12 g/dL nas mulheres.

A etiologia da anemia nos doentes insuficientes cardíacos tem sido classicamente descrita como multifactorial, tendo, no entanto, surgido mais recentemente evidências que apontam para um papel preponderante do ambiente pró-inflamatório criado pela libertação de citocinas neste contexto, que exercem a sua acção em vários sistemas e que, por último, vão condicionar o desenvolvimento de anemia.

A anemia da doença crónica, também denominada por anemia da inflamação, é a segunda causa de anemia mais prevalente em todo o mundo, a seguir à anemia por deficiência de ferro, e ocorre em condições de activação imune, aguda ou crónica.<sup>4</sup> Num estudo efectuado por Petrosyan et al, em idosos, a causa mais prevalente de anemia foi a marcada presença de marcadores inflamatórios, acometendo 62,1% dos indivíduos em estudo.<sup>5</sup> Sendo imuno-mediada, as citocinas e as células do sistema reticuloendotelial induzem alterações na homeostasia do ferro, na capacidade proliferativa dos precursores eritróides, na produção de eritropoetina (Epo) e no tempo de vida dos glóbulos vermelhos, alterações que resultam no desenvolvimento de uma anemia normocrómica, normocítica, habitualmente ligeira a moderada, com concentrações de hemoglobina raramente inferiores a 8g/dL.<sup>4</sup>

Avanços na compreensão da fisiopatologia da anemia no contexto de insuficiência cardíaca, aliado a crescente reconhecimento de que a inflamação é um contribuinte major para o seu desenvolvimento nestes doentes, tornaram peremptório o desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico diferencial, novos marcadores de prognóstico da insuficiência cardíaca e novas abordagens terapêuticas, que serão discutidas nesta dissertação.

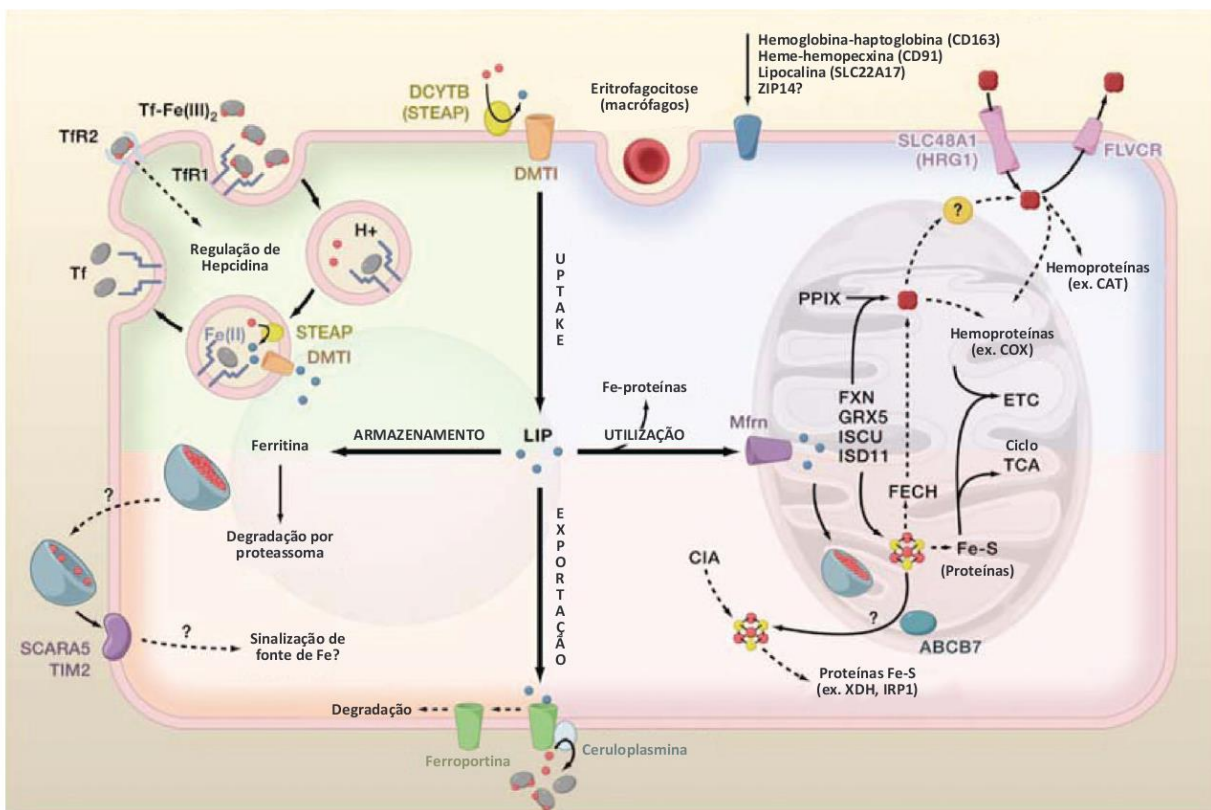
## **FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA DA INFLAMAÇÃO**

A anemia da doença crónica é principalmente encontrada em condições que cursam com activação imune crónica,<sup>6</sup> sendo as mais frequentes as infecciosas (agudas e crónicas), as do foro oncológico, as auto-imunes e por último as que, na sua fisiopatologia, cursam com inflamação.<sup>4</sup> Até mesmo o próprio ambiente pró-inflamatório de baixo grau, característico do idoso, pode resultar em anemia independentemente da presença concomitante de doença.<sup>7</sup> Este tipo de anemia desenvolve-se assim com frequências que variam entre os 8-95%, dependendo da população em estudo, sendo a sua prevalência agravada por algumas medidas terapêuticas como rádio ou quimioterapia.<sup>6</sup>

Esta anemia de severidade moderada é caracterizada por distúrbios típicos na homeostasia do ferro.

### **HOMEOSTASIA DO FERRO**

O ferro é um micronutriente incorporado em proteínas responsáveis pela respiração, crescimento e sobrevivência celulares. Ferro em excesso, no entanto, pode ser tóxico, resultando na produção exagerada de radicais livres e em disrupção disfuncional de membranas lipídicas, que em última análise condicionam morte celular e lesão de órgãos.<sup>8</sup> Assim, é peremptório que exista uma regulação apertada das vias que fornecem, utilizam, reciclam e armazenam ferro.<sup>9</sup>



**Figura 1. Homeostasia do ferro.** Na imagem demonstram-se os 4 mecanismos gerais de manipulação de ferro. Uma vez dentro da célula, a LIP (concentração de ferro lábil) é usada conforme as necessidades metabólicas. A maioria é transportado para as mitocôndrias para biossíntese do heme e participação em outras reações químicas. No citosol, o excesso é armazenado sob a forma de ferritina, molécula que pode ainda ser secretada na circulação. Ferro em excesso também pode ser excretado para a circulação através da ferroportina.

(Adaptado de Camaschella C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. <sup>10</sup>)

Em condições normais, o ferro encontra-se no sangue acoplado à proteína de transporte transferrina, que pode aceitar um máximo de duas moléculas de ferro. Este complexo transferrina-ferro é reconhecido por um receptor de superfície específico (TfR - receptor da transferrina), formando com ele um novo complexo TfR-transferrina-ferro que é então endocitado pelas células. Após acidificação do endossoma, o ferro dissocia-se do complexo anteriormente formado, processo que é facilitado pela ferriredutase

STEAP3.<sup>11</sup> Os eritroblastos, precursores de eritrócitos nucleados, expressam altos níveis de TfR, condição necessária para permitir o uptake de ferro a partir da transferrina diférrica sérica.<sup>7</sup> Uma vez incorporado nas células hematopoiéticas, através da acção do transportador transmembranar DMT-1, passa a pertencer ao pool intracitoplasmático de ferro e pode ser utilizado para a biossíntese de heme ou ser combinado com a apoferritina, originando uma molécula de ferritina, estrutura que armazena o metal, ao mesmo tempo que o mantém disponível para ser mobilizado.<sup>12</sup> O complexo apotransferrina-receptor é então reencaminhado para a superfície da célula e dissocia-se, mantendo-se o receptor ancorado na membrana plasmática e a apotransferrina livre na corrente sanguínea.<sup>6</sup> O sTfR é uma proteína constituída por uma única cadeia polipeptídica que deriva da clivagem proteolítica do receptor de transferrina, podendo ser quantificada no soro. A concentração plasmática de sTfR reflecte a densidade do receptor nas células e o número de células que o expressam, estando assim intimamente relacionado com a exigência celular de ferro e a taxa de proliferação eritropoiética.<sup>13</sup>

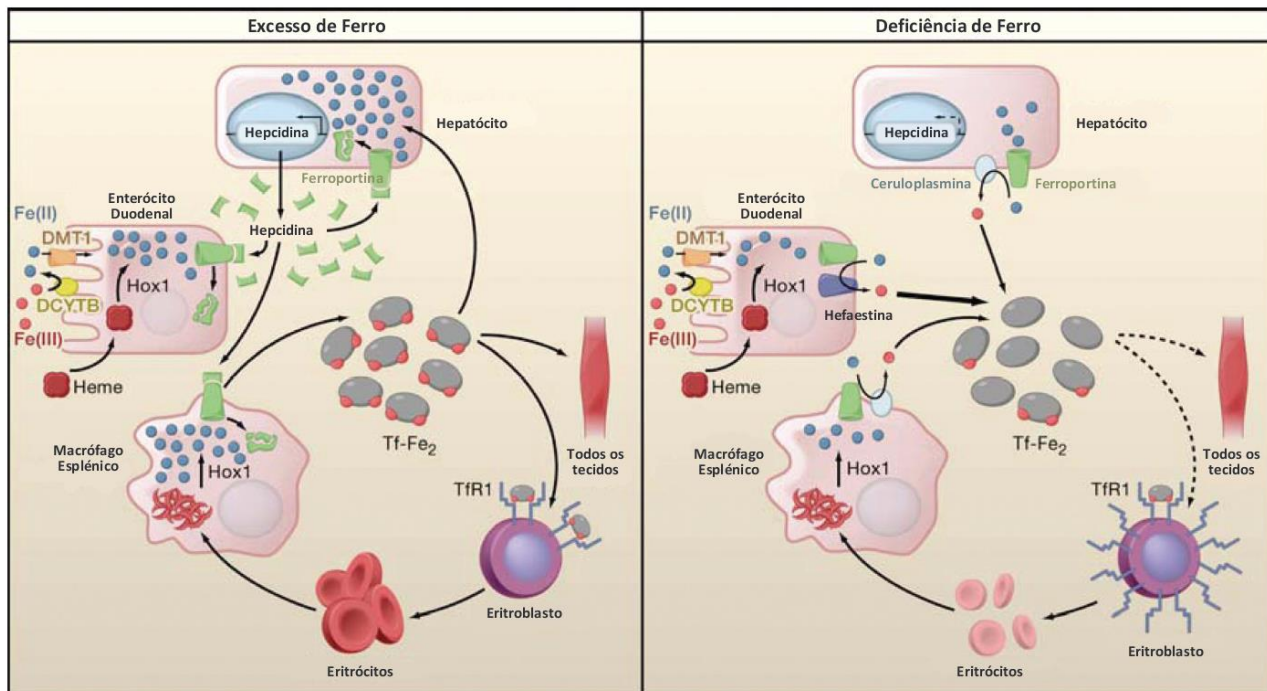
Cerca de 10-20% do ferro adquirido é mantido na forma de reservas mobilizáveis, necessário para a correcta manutenção das funções efectoras dos macrófagos e para a regulação da homeostasia celular.<sup>14</sup> Os macrófagos desempenham o importante papel de disponibilizar o ferro adquirido, processo essencial para que seja possível ocorrer reciclagem do ferro dos eritrócitos senescentes.<sup>6</sup> Para isso, dependem da ferroportina, um transportador transmembranar implicado na transferência basolateral de ferro para a circulação, que se encontra altamente expresso em enterócitos duodenais, células de Kupfer e macrófagos esplénicos.<sup>15,16</sup> Dado que a ferroportina é, até ao momento, o único exportador de ferro conhecido, a eficácia da eritrofagocitose e conseqüentemente da reciclagem do ferro estão intimamente ligadas

com a sua expressão.<sup>17</sup> Knutson et al demonstrou num primeiro estudo que a expressão de ferroportina em monócitos/macrófagos apresenta correlação positiva com a actividade eritrofagocitária<sup>17</sup> e, num segundo, que altos níveis de expressão de ferroportina resultam num aumento da libertação do ferro proveniente da eritrofagocitose.<sup>18</sup> Após os processos de hemofagocitose, processamento intramacrofagocitário do heme e libertação de ferro, devido à diminuição da concentração deste ião no interior da célula, os níveis de expressão da ferroportina diminuem.<sup>19</sup>

Existem várias vias através das quais os macrófagos/monócitos adquirem átomos de ferro, uma vez que a interacção que mantêm não se limita à distribuição do metal às células eritropoiéticas. Em primeiro lugar, estas células expressam receptores para a ferritina-H. Esta isoforma da ferritina pode estar envolvida no “turnover” do ferro,<sup>20</sup> uma vez que também circula no plasma e se liga especificamente a uma ampla variedade de células,<sup>21</sup> constituindo uma via alternativa de distribuição de ferro aos precursores eritroides.<sup>22</sup> Em segundo lugar, possuem receptores de superfície para a lactoferrina, um membro da família da transferrina, molécula que para além das actividades anti-bacteriana, anti-fúngica, anti-viral, anti-parasitária, imunomoduladora (regula a proliferação e activação de linfócitos, células NK e monócitos) e enzimática (é a proteína presente no leite com maior actividade amilase, DNase, RNase e ATPase<sup>23</sup>), tem a capacidade de captar ferro<sup>24</sup>. Em terceiro lugar os macrófagos podem fagocitar complexos de hemoglobina-haptoglobina, removendo-os da circulação, uma vez que possuem o receptor HbSR (hemoglobin scavenger receptor), também conhecido como CD163 ou M130, expresso exclusivamente em células da linhagem monocítica, principalmente em macrófagos dos tecidos fagocíticos.<sup>25</sup> Por último, a via mais importante para a aquisição de ferro por parte dos monócitos/macrófagos é a

eritrofagocitose.<sup>6</sup> Eritrócitos maduros circulam até se tornarem danificados ou senescentes (o que acontece após uma semi-vida média de 120 dias) e são então fagocitados predominantemente pelos macrófagos do sistema reticuloendotelial do fígado, medula óssea e baço.<sup>18</sup> Um estudo recente demonstrou que este processo ocorre não por fagocitose mas sim por macropinocitose, de uma forma semelhante ao “uptake” de células em apoptose, também efectuado pelos macrófagos.<sup>26</sup> Após o processo de eritrofagocitose, a hemoglobina é degradada por proteólise, dando origem a moléculas de heme que são então oxidadas e libertam átomos de ferro, que pode ser armazenado no interior do macrófagos ou libertado na circulação.<sup>18</sup>

A regulação da libertação do ferro é feita pela hepcidina. Esta proteína de fase aguda é maioritariamente produzida pelo fígado em resposta a sobrecarga de ferro mas também em resposta a mediadores inflamatórios, sendo posteriormente libertada na circulação. A hepcidina complexa-se com a ferroportina, levando à sua internalização e degradação por processos de ubiquitização,<sup>27</sup> controlando a absorção intestinal de ferro e a distribuição do mesmo a partir das reservas, incluindo os macrófagos reticuloendoteliais.<sup>28</sup> Citocinas pró-inflamatórias são estimuladores potentes da síntese de hepcidina, desempenhando assim um papel crucial no desenvolvimento de deficiência funcional de ferro vista na anemia da doença crónica.



**Figura 2. Regulação sistémica do ferro de acordo com as reservas de ferro.**

Demonstra-se aqui a regulação diferencial da hepcidina em condições de excesso de ferro (à esquerda) e excesso de ferro (à direita). Enterócitos duodenais capturam ferro do lúmen intestinal através da DMT1 (divalent metal transporter-1) após redução do ferro da forma férrica para a forma ferrosa. Na membrana basolateral, o ferro é exportado pela ferroportina (FPN) e oxidado pela hefaestina. A transferrina saturada (Tf-Fe<sub>2</sub>) entrega ferro às células através do Tfr1 (receptor 1 de transferrina). Após eritrofagocitose pelos macrófagos, o heme libertado gera átomos de ferro que é excretado no plasma através da FPN. Em condições de excesso de ferro, a alta concentração de hepcidina degrada a ferroportina, bloqueando a exportação de ferro. A BMP6 (proteína morfogenética óssea 6 – bone morphogenic protein 6), estimulada pelo ferro intracelular, aumenta a transcrição hepática de hepcidina. Em condições de deficiência de ferro, este é libertado pela FPN para a circulação, sem entraves. A produção de hepcidina é baixa devido a diminuída expressão de BMP6 e sinais inibitórios gerados por uma eritropoiese ferro-deficiente.

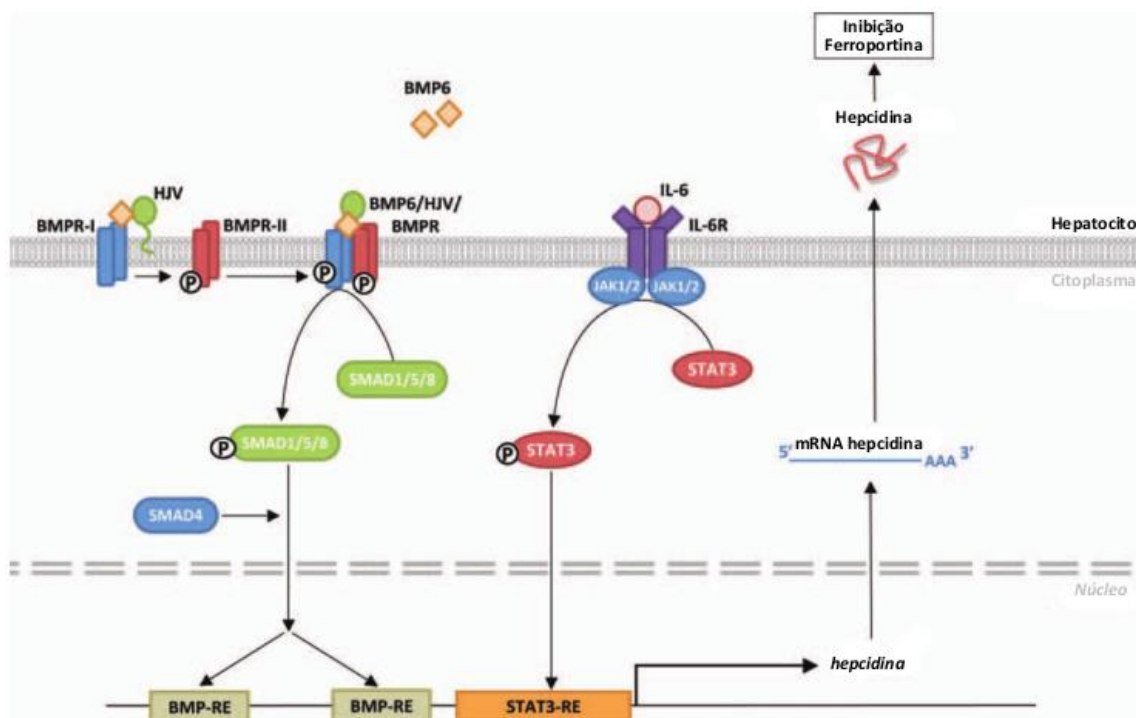
(Adaptado de Camaschella C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. <sup>10</sup>)



## **ALTERAÇÕES NA REGULAÇÃO SISTÉMICA DE FERRO EM PERÍODOS INFLAMATÓRIOS**

A presença de citocinas pró-inflamatórias implica retenção/bloqueio do ferro armazenado nas células do sistema reticuloendotelial, sob a forma de ferritina ou hemossiderina, o que leva a um desvio do ferro presente e disponível na circulação para locais de armazenamento resultando em disponibilidade limitada para as células progenitoras da linha eritróide e comprometimento da eritropoiese, um achado típico da anemia da doença crónica.<sup>6</sup> Monócitos/macrófagos desempenham um papel importante na regulação da homeostasia do ferro sob circunstâncias inflamatórias, sendo particularmente responsáveis pela indisponibilidade do metal que caracteriza a anemia da doença crónica.<sup>29</sup> Níveis elevados de hepcidina diminuem a absorção intestinal e bloqueiam a capacidade de exportação de ferro das reservas para a circulação com o objectivo de proteger o organismo de acumulação e distribuição excessiva deste micronutriente. Por consequência, exposição de macrófagos a níveis altos de hepcidina reduz significativamente o processo de reciclagem do ferro proveniente da eritrofagocitose, diminuindo também o efluxo de ferro não proveniente do heme.<sup>18,30</sup>

Em humanos que padecem de infecções crónicas ou doenças com severo componente inflamatório, são detectados altos níveis de hepcidina na urina,<sup>31</sup> ao mesmo tempo que em culturas de hepatócitos, foi demonstrado que a expressão de hepcidina foi induzida após exposição directa a LPS, resposta que era rapidamente suprimida com a adição de anticorpos anti-interleucina-6.<sup>32</sup> Adicionalmente, infusão de IL-6 em humanos induz rapidamente a expressão de hepcidina e hipoferrémia,<sup>33</sup> o que não acontece em ratos *IL-6 knock-out* que injectados com turpentina falham em desenvolver sobre-expressão de hepcidina e hipoferrémia.<sup>32</sup>



**Figura 1. Regulação da síntese de hepcidina pelas vias de sinalização BMP6-HJV-SMAD e IL-6-STAT3.** A BMP6 circulante combina-se com os receptores transmembranares de BMP tipo I e II (BMPR I e II) e com a hemojuvelina (co-receptor), formando um complexo na membrana hepatocitária que activa a cascata de sinalização SMAD, predominantemente a SMAD1/5/8. Estas conjugam-se com o mediador comum SMAD4, que migra para o núcleo activando a transcrição de hepcidina, através da indução dos elementos responsivos às BMP's (BMP-RE) no gene promotor da síntese de hepcidina. Em contexto inflamatório (presença em circulação de citocinas pró-inflamatórias), a IL-6 combina-se com o seu receptor e inicia uma via de sinalização através da activação das proteínas JAK1/2, que fosforilam o factor de transcrição STAT3. Este combina-se com um elemento responsivo a STAT 3 (STAT3-RE) no gene promotor proximal à hepcidina, activando-o. Ambas as vias são necessárias para a indução da transcrição de hepcidina mediada por IL-6.

(Adaptado de Sun CC et al. Targeting the hepcidin–ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation<sup>33</sup>)

Para comprovar a existência de um eixo LPS-IL6-hepcidina bem definido, que liga a imunidade inata ao metabolismo do ferro, Kemna et al criou um protocolo que previa a injeção de 2ng/kg de LPS, em humanos, o que induziu uma resposta

hipoferrémica detectável 6h após a injeção, tendo, às 22h, o ferro sérico atingido uma diminuição de 57%,<sup>32</sup> estando os níveis elevados de hepcidina correlacionados com elevados níveis de ferritina.

Uma molécula chave envolvida na detecção dos níveis de ferro sérico e na regulação da apropriada síntese de hepcidina é a HFE, uma proteína atípica pertencente à classe MHC I, expressa na superfície do hepatócito. O eixo HFE-hepcidina-ferroportina actua como um mecanismo central da manutenção da homeostasia do ferro. Mutações no gene *HFE* estão associadas com a doença de sobrecarga de ferro mais comum nos humanos, a hemocromatose hereditária tipo I. Trabalhos recentes demonstraram que a transcrição de hepcidina depende de interações funcionais entre sinais induzidos pela HFE e outros induzidos pelas BMP (2, 4 e 6). A ligação destas BMP ao seu receptor e co-receptor, hemojuvelina, expressa em hepatócitos, inicia uma cascata de eventos, incluindo a fosforilação do receptor SMADs 1, 5 e 8, que culmina na sobreexpressão do gene da hepcidina, sendo esta, portanto, uma das principais vias de regulação da sua expressão<sup>34</sup>. Das várias BMPs, a BMP6 parece ser aquela funcionalmente mais relevante na regulação de hepcidina in vivo.

Estudos recentes efectuados em modelos de doença inflamatória intestinal demonstraram que a BMP6 desempenha claramente um papel essencial no desenvolvimento da anemia da doença crónica, uma vez que a sua neutralização isolada diminui significativamente os níveis de hepcidina. No entanto, os níveis inflamatórios não se correlacionaram com aumentos na expressão de BMP6, o que sugere que apesar de esta ser necessária para a correcta expressão de hepcidina (a um nível basal), o estímulo efectivo para a sua sobreexpressão envolvia outro factor. As conclusões deste estudo apontam a IL-6 como esse factor.<sup>35</sup> A combinação dos sinais provenientes de ambas as vias da regulação da hepcidina é que se torna responsável pela sua

sobreexpressão, sendo também verdade que o bloqueio de qualquer uma destas vias leva à diminuição dos seus níveis.

Esta explicação é consistente com observações anteriores que demonstram que uma via BMP-SMAD intacta é necessária para que ocorra a sobreexpressão induzida por IL-6 e que os sinais activados pelas BMPs e IL-6 interagem provavelmente ao nível do promotor da hepcidina. Wang et al. demonstrou que estas vias não são inócuas e interagem, verificando respostas de transcrição de hepcidina atenuadas após injeção de IL-6 em ratos com a via da BMP abolida.<sup>34,35</sup>

De facto, um mecanismo molecular bem caracterizado através do qual a inflamação regula a expressão de hepcidina é a via IL-6/JAK2/STAT3. A presença de IL-6 estimula a activação da janus-cinase 2, que fosforila a transcrição do factor nuclear STAT3, um outro promotor da expressão da hepcidina.<sup>34</sup>

Assim, atingiu-se a conclusão de que a presença de mediadores inflamatórios, nomeadamente a presença de IL-6, interfere com múltiplas vias da regulação da expressão da hepcidina, daí o seu preponderante papel na regulação da homeostasia do ferro, principalmente em períodos de doença inflamatória crónica, e no desenvolvimento da anemia que caracteriza estes doentes.

O desenvolvimento de inibidores da via de sinalização da proteína morfogénica óssea pode assim constituir uma alternativa terapêutica de futuro para a inibição farmacológica da expressão de hepcidina no tratamento de indivíduos com anemia da doença crónica.

## **FISIOPATOLOGIA DA ANEMIA EM DOENTES COM INSUFICIÊNCIA CARDÍACA**

A fisiopatologia da anemia em doentes com insuficiência cardíaca é multifactorial e tem como causa, classicamente, quatro mecanismos principais: anemia da doença crónica, anemia por hemodiluição, anemia “renal” e anemia por malabsorção. O que estes mecanismos têm em comum são os níveis aumentados de citocinas, tais como IL-6 ou TNF- $\alpha$ , que estão directamente relacionadas com o grau de severidade da insuficiência cardíaca, actuando na disfunção endotelial, stress oxidativo, indução de anemia, apoptose dos miócitos, perda gradual de massa muscular esquelética e na libertação de BNP em resposta a stress miocárdico.<sup>37</sup>

O desenvolvimento eritrocitário procede-se inicialmente por uma fase eritropoietina-dependente, que dita a proliferação e sobrevivência dos precursores eritróides, sendo seguida de uma fase independente de eritropoietina, focada principalmente na síntese de hemoglobina.<sup>38</sup> A anemia que se desenvolve no contexto de insuficiência cardíaca pode ser consequência de afecção de ambas as fases.

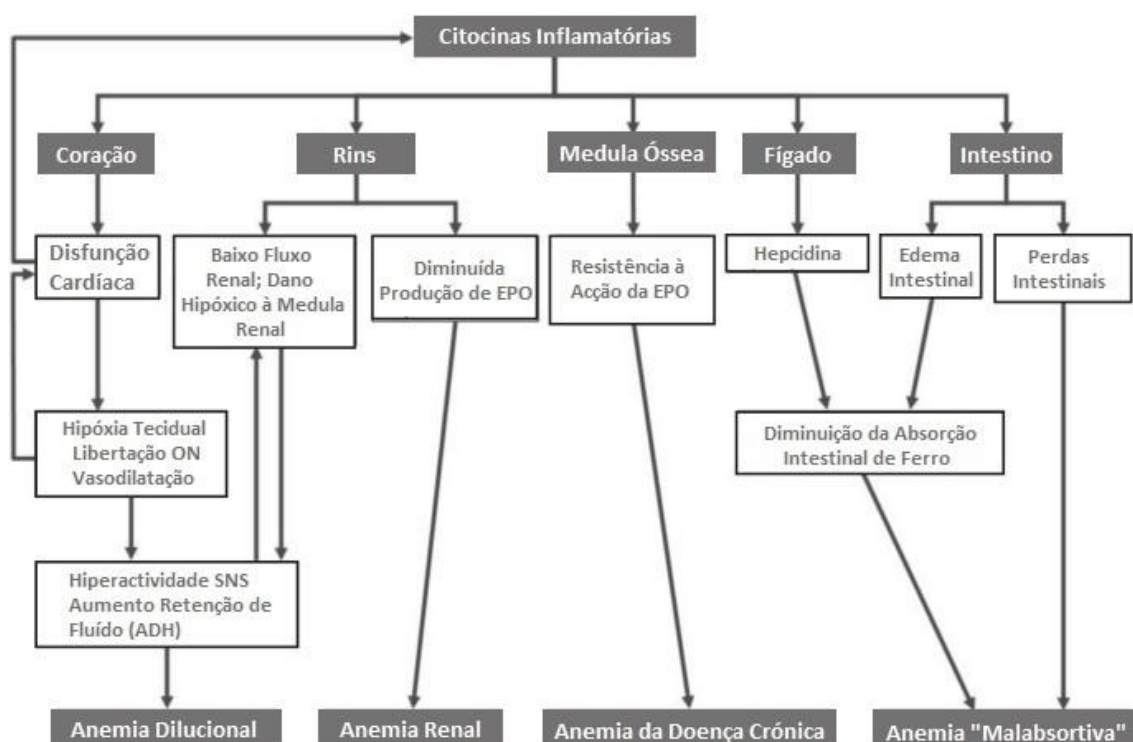
Todos os glóbulos vermelhos derivam de células hematopoiéticas primitivas que expressam antígenos CD-34 e que se comprometem com a linhagem eritróide, iniciando assim o processo de eritropoiese.<sup>39</sup> As células progenitoras BFU-E (Unidades de Formação Explosivas de Eritróides) são as primeiras células identificadas restritas à linhagem eritróide, e diferenciam-se em precursores eritróides (CD36+) e mais tarde em reticulócitos. Em doentes com anemia, a inability de aumentar a produção de reticulócitos, definida por uma contagem absoluta de reticulócitos baixa ou normal ou por um índice de produção de reticulócitos inferior a dois, é diagnóstica de produção eritrocitária deficiente (hipoproliferação).

Num estudo levado a cabo por Ezekowitz et al em doentes com insuficiência cardíaca e anemia, não foi encontrada uma causa específica para a mesma em mais de 58% dos doentes, tendo sido estes rotulados como portadores de anemia da doença crónica.<sup>40</sup> Num outro estudo semelhante, em que se procurou esmiuçar as causas para a anemia em doentes com insuficiência cardíaca, valores compatíveis com anemia normocítica foram encontrada em 71% dos doentes, dos quais sensivelmente 1/3 apresentavam disfunção renal com conseqüente descida na produção de Epo; 57% da população que compunha este estudo apresentava valores hematológicos compatíveis com anemia da doença crónica, em quem eram comuns a escassa utilização de aparentemente adequadas reservas de ferro, a activação excessiva de citocinas e a síntese diminuída de Epo.<sup>41</sup> Os resultados epidemiológicos deste estudo estão em linha com os do anteriormente mencionado. Na grande maioria destes doentes foi encontrada evidência de inadequada produção endógena de Epo e/ou defeituosa oferta de ferro para o processo de eritropoiese.<sup>41</sup> Num estudo de Okonko et al a prevalência de anemia com substrato ferro-deficiente (quer funcional - anemia da doença crónica, quer efectivo - anemia por défice de ferro) foi evidente em 17%, 72% e 100% dos doentes em classes funcionais NYHA I ou II, III e IV, respectivamente, sendo a anemia da doença crónica a etiologia dominante em cada estrato.<sup>42</sup>

Num outro estudo, levado a cabo por Martinez-Ruiz et al, em que os doentes insuficientes cardíacos incluídos se encontravam estáveis, com IMC e função renal conservados, não anti-coagulados e não anti-agregados, apresentando apenas ligeira deterioração funcional (NYHA classe II), foi observada, no follow-up a um ano, uma descida significativa dos valores de hemoglobina.<sup>43</sup> Neste estudo foram assim eliminadas várias variáveis de confundimento, tendo-se demonstrado um papel

predominante e crucial do ambiente inflamatório gerado para o desenvolvimento de anemia nestes doentes.

Por se tratar, segundo os estudos mencionados, da etiologia dominante para o desenvolvimento desta complicação nos doentes com insuficiência cardíaca, serão de seguida abordados os mecanismos que levam ao aparecimento de anemia da doença crónica, dando pouco relevo no contexto deste artigo à contribuição da hemodiluição (Figura 2).



**Figura 2. Principais mecanismos da fisiopatologia da Anemia na Insuficiência Cardíaca**

(Adaptado de Pereira CA; Anemia, Heart Failure and Evidence-Based Clinical Management)<sup>36</sup>

## **DEFICIENTE PRODUÇÃO DE ERITROPOIETINA**

Níveis inadequadamente elevados de Epo podem ser consequência da insuficiência renal crónica que muitas vezes complica a insuficiência cardíaca ou da expressão exagerada de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, não sendo estas mutuamente exclusivas.<sup>44</sup> Tanto IL-1 como TNF- $\alpha$  inibem directamente a produção de Epo in vitro em rins de rato, isolados mas perfundidos, e em células humanas de carcinoma hepatocelular.<sup>45</sup> Apesar de os níveis de Epo se encontrarem aumentados e se correlacionarem com a severidade da insuficiência cardíaca<sup>46</sup>, a par de várias outras condições inflamatórias, os doentes demonstram uma resposta insuficiente da Epo à hipóxia renal que prevalece. Trata-se assim de uma observação intrigante uma vez que os níveis de Epo se encontram elevados, mas muitas vezes insuficientemente, verificando-se ainda que a usualmente forte associação linear entre os níveis de Epo e de hemoglobina se encontra obscurecida.<sup>47</sup> Este facto sugere ainda que existe uma insensibilidade relativa à Epo por parte das células hematopoiéticas e que estas necessitam de níveis mais altos de Epo para manter uma eritropoiese adequada, tendo já sido demonstrado que os doentes com insuficiência cardíaca exibem uma profunda e generalizada disfunção medular que acomete as várias linhagens hematopoiéticas.<sup>47</sup>

## **RESISTÊNCIA MEDULAR À ERITROPOIETINA PRODUZIDA**

Resistência à Epo é frequentemente encontrada em doentes com insuficiência cardíaca. Níveis plasmáticos elevados de citocinas inflamatórias, particularmente TNF- $\alpha$  estão implicados neste processo e já foi demonstrada a sua interferência nas acções periféricas da Epo.<sup>48</sup>



Um estudo de Peter van der Meer et al demonstrou que apesar de ser mais frequente encontrar doentes que apresentam níveis de Epo mais baixos que o esperado para o grau de anemia e hipóxia renal que apresentam (39% da população em estudo), é também relativamente comum encontrar doentes com níveis de Epo mais altos que o esperado para a condição que apresentam.<sup>49</sup> Tecnicamente, doentes anémicos com níveis de Epo mais altos que o esperado são obviamente capazes de produzir Epo endógena, apresentando no entanto resistência medular à sua acção e conseqüente persistência de anemia.<sup>49</sup> Este estudo refere ainda que pode ser clinicamente relevante distinguir estes doentes daqueles com níveis mais baixos de Epo que o esperado, nos quais a anemia reflecte em maior grau disfunção renal do que insensibilidade medular à acção da Epo, uma vez que estes podem ter sensibilidade normal ou mesmo aumentada à hormona.<sup>49</sup>

A associação entre os níveis de Epo e a inflamação naqueles com possível resistência à sua acção, já foi previamente descrita.<sup>50</sup> Adicionalmente, dados in vitro demonstraram que são necessárias maiores concentrações de Epo para restaurar a proliferação de células provenientes da medula óssea na presença de citocinas inflamatórias.<sup>51</sup> No estudo de van der Meer et al, níveis de Epo mais altos que os esperados correlacionam-se positivamente com os níveis de proteína C-reativa.<sup>49</sup> Pensa-se que a resistência medular observada possa ser causada por “hiporregulação” específica dos receptores de Epo, condicionada pela presença de citocinas inflamatórias,<sup>47</sup> facto que ainda necessita de investigação.

## PAPEL DA INFLAMAÇÃO

As citocinas pró-inflamatórias desempenham um papel muito importante para o desenvolvimento de anemia da doença crónica nos doentes com condições inflamatórias crónicas,<sup>52,53</sup> nomeadamente a insuficiência cardíaca. Já foi mencionado atrás o efeito que estas podem ter na produção de Epo e na resistência à acção da mesma que as células da medula óssea apresentam mediante este ambiente. Iversen et al demonstrou que a indução de insuficiência cardíaca em ratos atenuou a população pró-eritroblástica da medula óssea em 40% em relação ao controlo e a sua capacidade proliferativa em 50%.<sup>54</sup> Foi identificada ainda destruição três vezes aumentada de precursores pro-eritroblásticos, ambas as observações com significativa correlação com os níveis de TNF- $\alpha$ . Ruifrok et al, para além dos defeitos encontrados na linhagem eritropoiética da medula óssea, quantificada pela diminuição das BFU-E, observou também diminuição do número de CFU-E (Unidades Formadoras de Colónias Eritróides) em 27%.<sup>55</sup>

Macrófagos activados suprimem a eritropoiese em indivíduos com doenças crónicas. Em situação fisiológica, os macrófagos residentes em locais hematopoiéticos são responsáveis pela libertação de factores de crescimento obrigatórios para o desenvolvimento óptimo das células eritróides. No entanto, envolta num contexto inflamatório, a activação dos macrófagos desencadeia uma libertação excessiva de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1b. Foi demonstrado em outras condições de marcado componente inflamatório em que se desenvolve anemia, que esta é mediada pela libertação de citocinas, nomeadamente TNF- $\alpha$ , interferão- $\beta$  e IL-1.<sup>56</sup>

Numa miríade de condições crónicas, a depleção de monócitos activados aumenta a formação de BFU-E<sup>39</sup>, enquanto a adição dos mesmos a BFU-E normais leva a inibição da formação de colónias. Co-incubação de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  pode

diminuir estes efeitos inibitórios.<sup>39</sup> O TNF- $\alpha$  aumenta assim a apoptose das células eritróides de forma directa, mas também de forma indirecta, por levar ainda ao aumento da síntese de IL-1 $\beta$  e interferão que têm os mesmos efeitos nas células da linhagem eritróide.<sup>39</sup>

Em humanos com IC, já foi demonstrado por vários autores uma relação inversa entre citocinas/marcadores inflamatórios e os níveis plasmáticos de hemoglobina.<sup>43</sup> No estudo de Martinez-Ruiz et al ficou patente que a inflamação desempenha um papel crucial para a descida dos níveis de hemoglobina e que o melhor indicador que reflecte esta variabilidade é o sTNFRI.<sup>43</sup>

## **PAPEL DA HEPCIDINA**

A função desempenhada pela hepcidina no desenvolvimento de anemia no contexto de várias doenças crónicas tem sido alvo de estudos nas mais diversas áreas da Medicina.<sup>33,57-60</sup>

No entanto, apenas alguns estudos foram efectuados com o intuito de avaliar os níveis de hepcidina no contexto da insuficiência cardíaca. Divakaran et al reportou que a concentração de hepcidina era menor nas amostras de urina provenientes dos doentes com insuficiência cardíaca do que em relação aos controlos. Quanto à concentração sérica da enzima, reportou que não havia diferenças significativas entre a população em estudo e o controlo, limitando assim a importância da acção da hepcidina na patogénese de anemia no contexto de IC.<sup>61</sup> Matsumoto et al refere mesmo que as concentrações séricas de hepcidina em doentes com IC e anemia se encontram diminuídas, tendo demonstrado que estas são reguladas pela Epo e reservas de ferro (correlação com os níveis de ferritina), e não por marcadores inflamatórios (IL-6).<sup>62</sup> É ainda avançada uma

hipótese que explique a observação documentada, sendo referindo que o aumento das concentrações de Epo nestes doentes, ainda que insuficiente, ao estimular o fenómeno de eritropoiese, estimula a secreção de factores circulatórios que suprimem a síntese de hepcidina no fígado.<sup>62</sup>

O factor de crescimento e diferenciação 15 (GDF15), marcador cardíaco intrinsecamente ligado a processos inflamatórios que em doentes com IC se encontra aumentado, é um desses factores. Este efeito inibitório da síntese de hepcidina está apenas comprovado na talassémia.<sup>63</sup> No entanto, no estudo de Martinez Ruiz et al, em doentes insuficientes cardíacos não anémicos, o valor de GDF15 é preditivo do desenvolvimento de anemia.<sup>43</sup>

Neste mesmo estudo foi no entanto observado que altas concentrações de hepcidina em doentes com insuficiência cardíaca se correlacionam com declínios maiores nos valores de hemoglobina e conseqüente desenvolvimento de anemia.<sup>43</sup> Este estudo postula assim que a inflamação é o elo que conecta a progressão da insuficiência cardíaca, reflectido pelos marcadores de stress cardíaco, e o desenvolvimento da anemia. De facto, sTNFRI e a saturação da transferrina correlacionaram-se positivamente com os níveis de NT-proBNP, o maior marcador de stress cardíaco em doentes insuficientes cardíacos.<sup>43</sup>

É possível, portanto, que a deficiência funcional de ferro, progressiva, aliada ao aumento da eritropoietina, sejam responsáveis pela diminuição dos níveis de hepcidina que é encontrada em doentes com insuficiência cardíaca crónica.

Adicionalmente, a eritropoiese com elevada restrição de ferro, evidente em ratos transgénicos com sobre-expressão de hepcidina, difere da anemia normocítica normocrómica que habitualmente caracteriza a anemia da inflamação em insuficientes cardíacos, facto que coloca em evidência que a inflamação crónica pode contribuir com

outras características, independentes da hepcidina, para o desenvolvimento de anemia.

<sup>64</sup> Outro exemplo que permite tirar as mesmas ilações é a inibição da expressão de hepcidina em ratos com abscessos estéreis crónicos, induzidos através do recurso a “turpentina”, acto que aumenta os níveis de hemoglobina mas não os normaliza. <sup>65</sup> O número de eritrócitos desceu significativamente nos ratos com abscessos com expressão de hepcidina abolida, que mantiveram os valores de hemoglobina corpuscular média dentro do normal, o que não aconteceu nos ratos transgénicos com sobre-expressão de hepcidina, que apresentavam números normais de eritrócitos mas uma diminuição da hemoglobina corpuscular média. A inflamação condicionou assim a diminuição do número de eritrócitos e anemia independentemente da hepcidina, que estava ausente. As características da anemia presente nos ratos com abscessos estéreis assemelha-se mais à descrição clássica da anemia da inflamação. <sup>64</sup>

A interpretação dos valores de hepcidina deve ser, assim, feita com cautela, uma vez que vários factores podem afectar a sua concentração, muitas vezes em sentidos opostos, como por exemplo, défices na síntese hepática, hemodiluição, níveis elevados de Epo ou alterações da homeostasia do ferro. <sup>61</sup> Por isso, ao contrário do que já aconteceu em relação a várias patologias, ainda não se conseguiu estabelecer com rigor qual o papel que a hepcidina desempenha no desenvolvimento de anemia em doentes com insuficiência cardíaca ou se este marcador pode mesmo vir a ter futuras implicações terapêuticas no que concerne a anemia. <sup>43</sup>

## **HEMODILUIÇÃO**

Concentração diminuída de hemoglobina pode ser também, com frequência, consequência da hemodiluição que frequentemente se produz, que por activação do

sistema renina-angiotensina-aldosterona leva a retenção de sódio e água. A disfunção cardíaca progressiva e a crescente hipóxia tecidual, libertação de óxido nítrico e vasodilatação perpetuam a activação do Sistema Nervoso Simpático e libertação excessiva de ADH, o que tem influência nos mecanismos supra explanados e confere um mecanismo adicional para o desenvolvimento de anemia. A sua presença confere mau prognóstico.

### **DEFICIÊNCIA ABSOLUTA DE FERRO**

Doentes com insuficiência cardíaca estão predispostos a deficiência de ferro/deficiências hematínicas decorrentes de várias anormalidades. De acordo com vários estudos, deficiência de ferro nestes doentes é reportada em percentagens muito variadas. Ezekowitz et al refere um diagnóstico de deficiência de ferro em 21% dos doentes anémicos.<sup>40</sup> Pelo contrário, Cromie et al não encontrou evidência específica de deficiência de ferro numa coorte de 39 doentes anémicos com insuficiência cardíaca.<sup>66</sup>

O papel da deficiência de ferro parece apenas ser relevante quando nos referimos a uma deficiência funcional de ferro, sendo os resultados em relação à prevalência e consequências da deficiência de ferro absoluta inconsistentes.

## MARCADORES PROGNÓSTICO

Uma precisa estratificação de risco em doentes com insuficiência cardíaca é criticamente importante para direccionar eficientemente as terapias baseadas na evidência e identificar os doentes em alto risco que podem beneficiar de tratamentos avançados. Ensaios clínicos e estudos de observação identificaram múltiplos factores prognósticos em doentes com insuficiência cardíaca aguda descompensada, incluindo deterioração da função renal, peptídeo natriurético cerebral, hiponatrémia e troponinas cardíacas.<sup>67</sup>

Um estudo efectuado por Pocock et al. identificou 21 preditores independentes de mortalidade e morbidade em doentes com insuficiência cardíaca. As variáveis com maior valor prognóstico, definido por maior capacidade preditiva de mortalidade ou hospitalizações, foram idade avançada, diminuída fracção de ejeção e diabetes mellitus (Tabela 1).<sup>68</sup> No entanto, este estudo não teve em linha de conta factores como anemia ou o valor de RDW (red blood cell distribution width).

Utilizando a mesma base de dados, fornecida pelo estudo CHARM, Felker et al conseguiu identificar que níveis elevados de RDW são um forte preditor independente de grande morbidade e mortalidade em doentes com insuficiência cardíaca. O RDW apresenta uma grande associação com o prognóstico dos doentes, mesmo após ajuste estatístico com as várias variáveis clínicas e laboratoriais, tais como classe funcional NYHA ou função renal, tornando-se este o primeiro estudo a identificá-lo como tal.<sup>69</sup>

**Tabela 1. Modelos finais de prognóstico de mortalidade CV ou hospitalização por Insuficiência Cardíaca (baseado em modelos de regressão Cox)**

Variável	Hazard ratio	IC inferior (95%)	IC superior (95%)	Valor $\chi^2$	Coeficiente	Desvio-Padrão
Idade (cada 10A acima dos 60A)	1,46	1,38	1,54	181,8	0,379	0,028
Diabetes insulino-tratada	2,03	1,80	2,29	134,7	0,707	0,061
Diabetes: outros	1,58	1,43	1,74	85,2	0,455	0,049
FE (por descida de 5% abaixo de 45%)	1,13	1,11	1,16	119,9	-0,123	0,011
IMC (por 1kg/m <sup>2</sup> de descida abaixo de 27,5%)	1,03	1,01	1,04	9,2	-0,026	0,009
Sexo F	0,83	0,76	0,91	15,5	-0,183	0,047
Classe NYHA III	1,32	1,20	1,45	33,7	0,278	0,048
Classe NYHA IV	1,54	1,25	1,89	16,8	0,430	0,105
Fumador	1,09	0,97	1,22	1,9	0,083	0,060
BR cardíaco	1,26	1,15	1,38	26,3	0,231	0,045
Cardiomegália	1,35	1,23	1,47	42,0	0,297	0,046
Hospitalização por IC nos últimos 6 meses)	1,73	1,55	1,93	94,9	0,547	0,057
Hospitalização por IC não nos últimos 6 meses)	1,22	1,09	1,37	11,9	0,200	0,058
TAD (por descida de 10 mmHg)	1,11	1,07	1,16	28,9	-0,107	0,020
Diagnóstico de IC há mais de 2 anos	1,31	1,20	1,43	36,2	0,268	0,045
EAM Prévio	1,11	1,02	1,21	6,3	0,108	0,043
Edema dependente	1,23	1,12	1,35	20,2	0,208	0,046
FC (por 10 bpm)	1,08	1,05	1,11	25,7	0,078	0,015
Crepitações pulmonares	1,25	1,13	1,38	18,0	0,221	0,052
Edema Pulmonar	1,26	1,03	1,54	5,1	0,231	0,102
Regurgitação Mitral	1,16	1,05	1,28	9,1	0,150	0,050
FA	1,16	1,07	1,27	11,3	0,151	0,045
Dispneia em repouso	1,20	1,10	1,31	16,0	0,182	0,045
Candesartan (vs placebo)	0,82	0,76	0,89	23,7	-0,197	0,041

(Adaptado de Pocock SJ et al. Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure<sup>67</sup> )



## **RED CELL DISTRIBUTION WIDTH – RDW**

O RDW foi recentemente descrito como um forte preditor de mortalidade ou hospitalizações no contexto de insuficiência cardíaca, tanto estável como descompensada,<sup>69-74</sup> ganhando importância a partir do momento em que Felker et al o identificou como o marcador laboratorial mais preditivo de prognóstico, com base no base de dados do estudo CHARM.<sup>69</sup>

Vários estudos demonstraram que a associação dos níveis de RDW com a mortalidade (“all-cause”) pode ser independente dos níveis de hemoglobina/anemia, especialmente no contexto de episódios agudos de insuficiência cardíaca, apesar de estarem intrinsecamente ligados.<sup>70,71</sup> O RDW pode assim ser um indicador precoce do desenvolvimento de anemia por preceder a mesma em doentes com insuficiência cardíaca,<sup>75,76</sup> uma vez que este tem sido repetidamente associado com um ambiente pró-inflamatório e comprometimento do metabolismo do ferro, ambas condições envolvidas na etiopatogenia da anemia nestes doentes.<sup>77</sup>

O RDW é um parâmetro hematológico que constitui uma medida da variabilidade do tamanho dos eritrócitos em circulação, ou seja, trata-se de um marcador de anisocitose. Este é muitas vezes usado na classificação ou diagnóstico diferencial de anemia e na detecção de deficiências de ferro ou folatos numa fase precoce.<sup>76,78</sup> O seu valor aumenta em situações de eritropoiese ineficiente ou de destruição aumentada de eritrócitos, como marca da crescente heterogeneidade dos glóbulos vermelhos em circulação,<sup>76</sup> ou seja, reflecte a presença de glóbulos imaturos no sangue periférico. Os dados presentes na literatura suportam fortemente o papel fundamental que a inflamação tem na indução de eritropoiese ineficaz, o que é bem reflectido pelo aumento dos níveis de RDW.<sup>70</sup>

Até agora, um largo leque de variáveis clínicas tem sido usado para criar modelos preditivos da sobrevivência de doentes com insuficiência cardíaca, mas apenas recentemente surgiu evidência de que o RDW tem elevado valor prognóstico pelo que não é ainda frequentemente considerado.<sup>69,72,77-79</sup> O interesse neste marcador tem sido crescente nos últimos anos, uma vez que níveis mais altos deste têm sido associados a um risco aumentado de mortalidade cardiovascular mas não exclusivamente, em doentes com insuficiência cardíaca mas também com outras doenças crônicas.<sup>69,76,80</sup>

De entre doentes insuficientes cardíacos crônicos que não apresentam anemia, o seu aparecimento *de novo* aumenta com o passar do tempo, com prevalência de 14% ao 1 ano a 27% aos 5 anos após o diagnóstico.<sup>81</sup> Uma vez que foi demonstrado que tanto o decréscimo ligeiro nos valores de hemoglobina como o desenvolvimento de anemia franca apresentam valor prognóstico nestes doentes, acarretando nos mesmos um aumento da mortalidade,<sup>80,82</sup> torna-se imperativo identificar quais os doentes em alto risco de desenvolver anemia.<sup>76</sup>

O principal achado do estudo de Pascual-Figal et al. foi que a medição do valor de RDW após a alta, em doentes internados por um episódio de agudização de insuficiência cardíaca, emerge como um marcador independente e precoce da evolução dos valores de hemoglobina, identificando o risco de desenvolvimento de anemia *de novo* nos primeiros seis meses após o episódio.<sup>76</sup>

O RDW manteve-se, em vários estudos, um preditor forte e independente de eventos clínicos (re-hospitalizações por agudização dos sintomas de insuficiência cardíaca ou mortalidade), revelando uma associação estatística com a mortalidade ainda mais forte que a do NT-proBNP, fracção de ejeção, classe funcional NYHA e função renal,<sup>69</sup> sendo o valor de hemoglobina um preditor de eventos clínicos com significado muito limitado quando comparado ao RDW.<sup>73</sup> Este estudo revelou ainda que o RDW se

trata de uma variável que reflecte de uma forma integrada a produção ineficaz de eritrócitos, inflamação, malnutrição e acometimento da função renal, uma vez que todos estes têm, individualmente, impacto na maturação eritrocitária e conseqüentemente no valor do RDW.<sup>73</sup>

Valores elevados de RDW estão também associados com descidas na concentração de ferro sérico, ferritina e saturação da transferrina, e aumento dos níveis de sTfR. Com base nestas observações, o RDW afigura-se ainda como um marcador proeminente de anemia da doença crónica complicada com deficiência de ferro em doentes com insuficiência cardíaca.<sup>73</sup> Uma vez que a elevação de citocinas pró-inflamatórias é um marco da insuficiência cardíaca, tanto em fases iniciais como em estadios mais avançados, é lícito especular que a anisocitose reflecte não só alterações na eritropoiese relacionadas com este ambiente pró-inflamatório que caracteriza o insuficiente cardíaco, como também complicação com défice de ferro, daí ser um marcador com tão elevado valor prognóstico nestes doentes.<sup>73</sup> Níveis elevados de RDW correlacionaram-se também com concentrações séricas altas de Epo, indicando que pode dar informações sobre a possibilidade de existir algum grau de resistência à acção da hormona por parte da medula óssea.<sup>73</sup> Neste estudo foi novamente descrita a correlação entre os valores de RDW e os diferentes marcadores inflamatórios (citocinas, receptores solúveis de citocinas e reagentes de fase aguda), indicando uma relação biológica importante.<sup>73</sup>

Mesmo identificadas estas correlações com os mais variados biomarcadores, o risco definido pelo RDW é independente daquele conferido por outros factores de risco cardiovascular estabelecidos (idade, sexo, diabetes mellitus, pressão arterial sistólica e colesterol), função renal, inflamação (níveis de IL-6 ou PCR) e alterações no metabolismo do ferro.<sup>74</sup>

Tem sido constatado ainda que a utilidade clínica deste marcador não se limita a prever que doentes desenvolverão anemia. Num estudo efectuado por Agarwal et al. observou-se uma associação significativa entre a elevação do valor do RDW com progressivamente mais baixos níveis de aptidão cardiorrespiratória.<sup>75</sup> Níveis baixos de aptidão cardiorrespiratória foram ainda correlacionados com altos níveis de PCR.<sup>75</sup> Esta aptidão tem demonstrado ser um dos mais fortes preditores de morbimortalidade em doentes com ou sem doença cardíaca.<sup>75</sup> Vários estudos demonstraram que existe uma relação inversa “dose-dependente” entre a mortalidade cardiovascular e a aptidão cardiorrespiratória ou capacidade de praticar exercício,<sup>83-85</sup> relação que parece até ser precisa em indivíduos aparentemente saudáveis, não insuficientes cardíacos.<sup>74</sup>

Alterações nos níveis de RDW durante as hospitalizações, identificadas através de medições seriadas do mesmo durante os internamentos, são também valorizáveis e apresentam um forte valor prognóstico de mortalidade ou re-hospitalização, inclusivamente naqueles doentes que à admissão apresentavam valores normais.<sup>78</sup> A mesma relação é verificada em doentes cujo RDW baixa durante a hospitalização, adquirindo estes substancial melhoria prognóstica.<sup>78</sup>

A relação entre os valores de RDW e o prognóstico não é linear nos percentis superiores do valor do parâmetro hematológico.<sup>74</sup> Foi já proposto um cut-off com limites entre 15,0% e 15,5% para o seu valor, sendo a partir deste que apresenta a maior capacidade preditiva e de reclassificação do risco dos doentes.<sup>69,77</sup> O RDW deve ser usado em conjunto com outro indicador hematológico acessível e de baixo custo, o MCV; o achado de um valor de RDW crescente com um MCV em decréscimo é mais ominoso que um RDW crescente isolado.<sup>86</sup>

Estas descobertas sugerem que o RDW deve ser tido em conta na prática clínica, especialmente dada a sua acessibilidade e custo reduzido, e que devem ser efectuadas

medições seriadas do mesmo, durante as hospitalizações dos doentes e aquando da sua nota de alta. O desenvolvimento de novos modelos de prognóstico que tenham em conta este parâmetro é imperativo.

## **IMPLICAÇÕES PROGNÓSTICAS DA PRESENÇA DE ANEMIA EM DOENTES INSUFICIENTES CARDÍACOS**

Anemia franca ou baixos níveis de hemoglobina têm consistentemente demonstrado ser indicadores independentes de risco aumentado de mortalidade e hospitalizações em doentes insuficientes cardíacos<sup>3</sup> ou outros, especialmente idosos, em comparação com indivíduos não anémicos.<sup>87,88</sup> Este risco mantém-se mesmo quando é ajustado tendo em conta um largo número de variáveis confusionais.<sup>87</sup> A presença de anemia aumenta o risco relativo de morte de um doente insuficiente cardíaco em 20-50%,<sup>3</sup> estando também pequenas descidas no valor de hemoglobina associadas com aumento da mortalidade.<sup>89</sup> Este risco aumentado de mortalidade está mais associado com a presença de anemia da inflamação do que com outras, como por exemplo a  $\beta$ -talassémia menor.<sup>87</sup>

Cerca de 80% dos doentes internados com insuficiência cardíaca têm mais de 65 anos e os idosos apresentam uma taxa de readmissão aos 6 meses de 50%;<sup>90</sup> é nestes indivíduos que as consequências da anemia podem ter efeitos mais deletérios. Segundo a revisão efectuada por Silverberg et al, de 21 estudos que examinaram a relação entre a severidade da insuficiência cardíaca e anemia, 17 (81%) demonstraram que a presença de anemia está associada com um grau de insuficiência cardíaca mais severo, como determinado pela classe funcional da NYHA.<sup>91</sup> Em idosos, a consequência mais importante da presença de anemia é assim a dependência funcional.<sup>92-94</sup> A anemia após

os 65 anos de idade, mesmo que ligeira, condiciona diminuição da capacidade de realizar actividades do dia-a-dia e dificuldades na mobilidade <sup>92,95</sup>, para além de aumentar o risco de ocorrência de complicações terapêuticas. <sup>96</sup>

Ainda não está absolutamente claro, no entanto, se a anemia é um mediador ou apenas um marcador de pior prognóstico nos insuficientes cardíacos. <sup>3</sup> Foi descrito que a presença desta complicação está associada com uma maior tendência para o eventual desenvolvimento de insuficiência cardíaca na população em geral, no estudo de Framingham. <sup>91</sup> Em outros estudos efectuados em doentes idosos com função renal normal <sup>97</sup>, e em doentes com doença cardíaca isquémica, <sup>98</sup> a presença de anemia aumenta o risco de desenvolver insuficiência cardíaca. Outros documentaram que o seu aparecimento ao longo do curso da doença contribui para a progressão da mesma <sup>99</sup> podendo também exacerbar doença cardíaca isquémica ou causar insuficiência cardíaca de alto débito, podendo a anemia ser assim considerada um importante factor causal ou de progressão da insuficiência cardíaca.

Por sua vez, estudos efectuados em doentes com insuficiência renal e anemia demonstraram uma diminuição da massa do ventrículo esquerdo, melhoria da fracção de ejeção e diminuição dos volumes sistólicos e telediastólicos do ventrículo esquerdo quando estes foram submetidos a tratamento com Epo, condições que se deterioraram novamente após suspensão do tratamento <sup>100</sup>, demonstrando os efeitos deletérios que a anemia pode condicionar no músculo cardíaco. <sup>91</sup> Outros estudos, estes efectuados em indivíduos com insuficiência cardíaca, demonstraram resultados semelhantes, com o tratamento da anemia a melhorar dramaticamente o seu estado de saúde, <sup>101</sup> tendo em conta parâmetros como a classe funcional NYHA, fracção de ejeção do ventrículo esquerdo, taxas de hospitalização e dosagens de diuréticos. <sup>101,102</sup>

O doseamento do BNP é um teste útil no diagnóstico de insuficiência cardíaca, fornecendo evidência de disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo; está descrito que mesmo em doentes sem insuficiência cardíaca, concentrações diminuídas de hemoglobina são suficientes para produzir concentrações séricas de NT-proBNP acima dos cutoffs diagnósticos, independentemente do sexo, IMC, taxa de filtração glomerular, hipertrofia ventricular esquerda e doença valvular,<sup>103</sup> Um aumento de 1g/dL na concentração de hemoglobina mantido por 24 meses foi associado a uma descida de 4,1g/m<sup>2</sup> na massa do ventrículo esquerdo,<sup>104</sup> demonstrando o potencial efeito benéfico que a correcção de anemia pode ter no prognóstico destes doentes.

Clinicamente, doentes insuficientes cardíacos com anemia têm frequências cardíacas mais elevadas, tensões arteriais mais baixas e sinais de diminuída perfusão periférica, necessitando mais frequentemente de maiores prescrições de diuréticos<sup>105</sup> e em doses mais altas<sup>101</sup>, indicando que apresentam frequentemente maior resistência a terapia médica que doentes não anémicos. Estes doentes apresentam ainda maior risco de eventos cardiovasculares e sinais de dano cardíaco como hipertrofia ventricular esquerda, maiores dimensões atriais, maiores pressões de enchimento ventricular e níveis mais elevados de BNP.<sup>91</sup>

No entanto, a associação entre as concentrações de hemoglobina e mortalidade não se pode considerar linear, sendo sugerida uma curva em forma de “J” para a descrever, ocorrendo exponencialmente mais mortes com concentrações baixas de hemoglobina, já no território de anemia franca.<sup>106</sup> Tem ainda sido proposto por vários autores que os limites inferiores para a definição de anemia segundo a OMS podem estar desajustados em relação ao contexto actual e devem ser revistos, especialmente em relação aos idosos<sup>92,95,107</sup>. À luz destes potenciais novos critérios, a presença de anemia e as consequências que dela advém têm sido frequentemente sub-diagnosticadas.

Assim, apesar das evidências dos efeitos deletérios que a anemia contrai para os doentes com insuficiência cardíaca, esta nem sempre é reconhecida pelos internistas ou cardiologistas. Num estudo da “Cleveland Clinic”, 29% dos insuficientes cardíacos admitidos desenvolveram anemia; no entanto esta apenas foi reconhecida pelos internistas como um diagnóstico em 11,1% dos casos e pelos cardiologistas em 4,4% dos casos; a avaliação subsequente apenas foi efectuada em 6% dos doentes e apenas 10% foram tratados, daí que a sua conclusão tenha sido que em doentes insuficientes cardíacos seguidos em ambulatório, a anemia seja sub-reconhecida, sub-diagnosticada e sub-tratada.<sup>108</sup>



## DIAGNÓSTICO

O amplo cenário em que pode ocorrer o desenvolvimento de anemia da doença crónica pode complicar o diagnóstico da mesma. Condições como deficiências nutricionais, hemorragia ou hemólise, infecções ou infiltração da medula óssea e polimedicação podem todas afectar o quadro hematológico.<sup>109</sup>

Tipicamente, a anemia é ligeira a moderada, estando a concentração de hemoglobina acima de 10g/dL e o hematócrito a 60% do valor basal, sendo normocrómica e normocítica com contagens de reticulócitos baixas, apesar de próximas do normal, reflectindo a natureza hipoproliferativa da mesma.<sup>99</sup> A partir da análise do hemograma pode ainda inferir-se a presença de inflamação, que é reflectida por neutrofilia, monocitose ou trombocitose, podendo ser efectuar-se a medição de marcadores inflamatórios inespecíficos como a velocidade de sedimentação e a proteína C-reactiva (PCR).<sup>109</sup>

A anemia da doença crónica e a anemia por deficiência de ferro são as duas formas mais prevalentes desta condição hematológica, também em doentes com insuficiência cardíaca.<sup>5,110</sup> A distinção entre as duas permite guiar apropriadamente os regimes terapêuticos no que diz respeito à estratégia para a repleção das reservas de ferro.<sup>111</sup> Num estudo efectuado por Nanas et al em doentes insuficientes cardíacos com anemia, apesar de o diagnóstico mais comum ter sido o de anemia por deficiência de ferro, na maioria destes não foi encontrada uma causa específica para a mesma.<sup>112</sup> Não obstante a deficiência de ferro poder representar um mecanismo fisiopatológico para o desenvolvimento de anemia no insuficiente cardíaco, a inflamação crónica, consequência de doença crónica, prevalece como a causa subjacente para a maioria destes casos.<sup>113</sup> No entanto, independentemente da etiologia subjacente, a deficiência

de ferro apresenta-se como um importante potencial alvo terapêutico e deve ser efectuada a exclusão da mesma em qualquer doente com insuficiência cardíaca e anemia da doença crónica, dado que ambas coexistem com frequência.<sup>109</sup>

A anemia da doença crónica e a anemia por deficiência de ferro distinguem-se inicialmente por parâmetros estimativos dos níveis de ferro, tais como ferritina, ferro sérico, total iron binding capacity (TIBC) ou transferrina e a sua saturação (tabela 2).<sup>114</sup>

**Tabela 2. Valores Laboratoriais comparando Anemia da Doença Crónica com Anemia por Deficiência de Ferro**

Testes Laboratoriais	Anemia Doença Crónica	Anemia por Défice Ferro
Hematócrito	60% da linha basal	Diminuído
Hemoglobina	>10	Diminuído
VCM	Normal/ligeira redução	Inicial: normal; Tardio: diminuído
Morfologia GV	Não diagnóstico	Aumento da variabilidade
Reticulócitos	Próximo do normal	Diminuído
Ferro sérico	Baixo	Baixo
TIBC	Baixo	Alto
Ferritina	Normal ou aumentada	Baixo
Saturação de Transferrina	Muito baixa	Tardio, inferior a 15%

(Adaptado de Mayhew M., Anemia of Chronic Disease in the Elderly<sup>99</sup>)

No entanto, estes testes são afectados pelas doenças com componente inflamatório crónico, o que impede a sua interpretação clínica.<sup>115</sup> Os níveis de ferritina encontram-se diminuídos na anemia por deficiência de ferro, mas dado tratar-se de uma proteína de fase aguda, esta aumenta na presença de um ambiente pró-inflamatório, podendo atingir níveis três vezes superiores aos basais. Os níveis de ferro sérico, TIBC e transferrina também se encontram alterados quando as duas condições co-existem.<sup>114</sup> Assim, houve necessidade de encontrar novos testes diagnósticos, não invasivos, que

permitam definir e distinguir a ocorrência de ambas as condições concomitantemente, uma vez que o melhor método para distinguir IDA de ACD continua a ser um exame invasivo da medula óssea.<sup>116</sup>

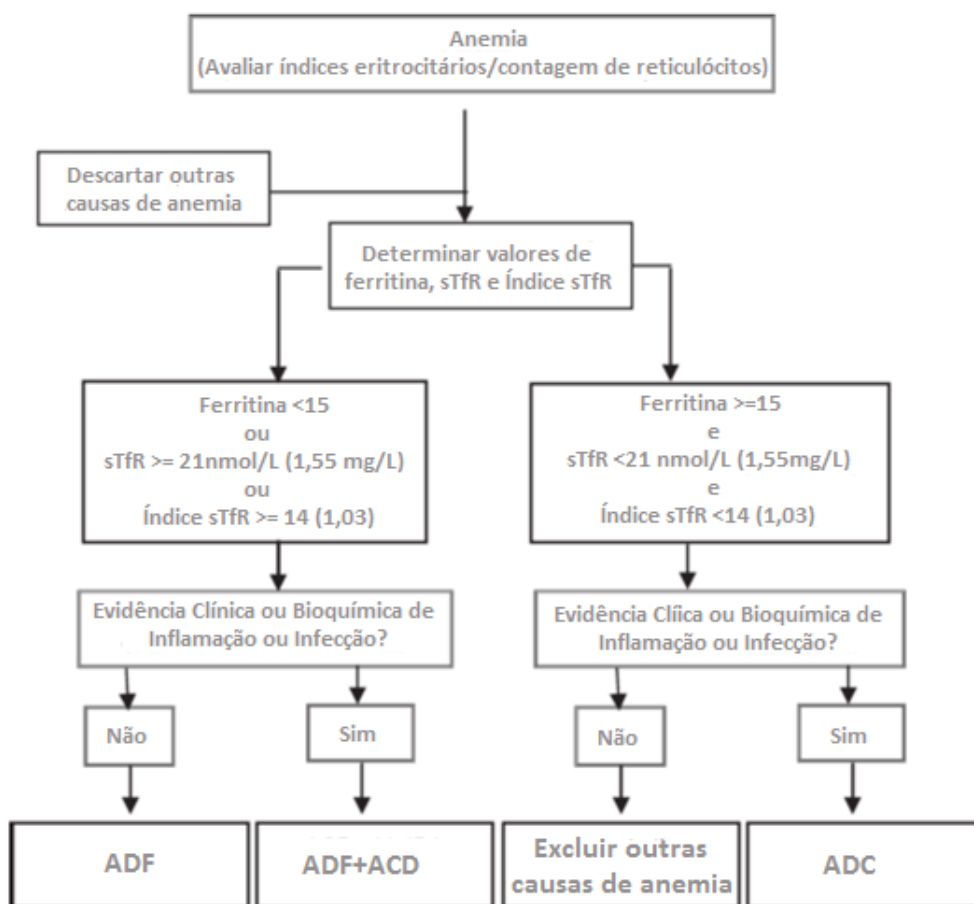
Em contraste com os anteriormente citados, foi demonstrado que o sTfR é um indicador de deficiência de ferro que não é afectado por doenças inflamatórias crónicas.<sup>114</sup> A concentração de sTfR circulante é proporcional à expressão celular do receptor membranar TfR, estando aumentada quando há necessidades aumentadas de ferro/deficiências de ferro,<sup>117</sup> mas mantendo-se dentro dos valores normais em doentes com anemia da doença crónica, uma vez que a sua expressão nestes doentes é negativamente afectada pelas citocinas inflamatórias.<sup>118</sup> Dado que a ferritina sérica reflecte o compartimento de reserva de ferro e o valor de sTfR reflecte o compartimento funcional, o índice *sTfR/log ferritina* (*sTfR índice*) tem sido apontado como um bom indicador do status corporal de ferro (Tabela 3).<sup>114,117,119,120</sup>

**Tabela 3. Sensibilidade e Especificidade da Ferritina, sTfR e índice sTfR usados isoladamente ou em combinação<sup>a</sup>**

	<b>Sensibilidade</b> (% doentes com ADF ou ADF+ACD correctamente identificados)	<b>Especificidade</b> (% doentes com ADC (com ou sem ADF) correctamente identificados)
Ferritina <15 ng/mL	41	96
Ferritina <30 ng/mL	59	93
sTfR ≥ 21nmol/L (≥ 1,55 mg/L)	86	49
Índice sTfR ≥ 14 nmol/L (≥ 1,03 mg/L)	81	83
Ferritina <15ng/mL ou sTfR ≥ 21nmol/L ou Índice sTfR ≥ 14 mg/dL	92	49
<sup>a</sup> O uso de todos os parâmetros em combinação dobrou a detecção de ADF, de 41% (ferritina isoladamente) para 92% (ferritina, sTfR e Índice sTfR).		

(Adaptado de Skikne B, Punnonen K. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor.<sup>113</sup>)

Doentes com anemia por défice de ferro, com ou sem anemia da doença crónica concomitante, apresentam valores mais altos de sTfR e *sTfR index* quando comparados com doentes que apenas tenham anemia da doença crónica. Valores de sTfR maiores ou iguais a 1,55mg/L e Índices sTfR superiores ou iguais a 1,03 mg/L são preditivos de deficiência de ferro (Figura 3).<sup>114</sup>



**Figura 3. Algoritmo para o diagnóstico diferencial de Anemia da Doença Crónica (ADC), Anemia por Déficit de Ferro (ADF), e ADC/ADF concomitantemente.**

(Adaptado de Skikne, BS; Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor and the sTfR/log ferritin index)<sup>113</sup>

Recentemente têm sido criados novos índices eritrocitários que podem ter utilidade na distinção entre anemia da doença crónica e anemia por deficiência de ferro, nomeadamente o *conteúdo reticulocitário de hemoglobina* (CHr), uma medida da hemoglobina nos eritrócitos mais recentemente formados, e a *percentagem de glóbulos vermelhos hipocrómicos* (%HYPO), que indica a percentagem de glóbulos vermelhos com concentrações de hemoglobina inferiores a 280g/L, ambos oferecendo informação em relação ao fornecimento de ferro ao precursor eritróide.<sup>109</sup>

O primeiro é um parâmetro que fornece uma avaliação relativamente aguda da actividade recente (48h) da medula óssea, identificando reticulócitos recém-formados ferro-deficientes, sendo o último semelhante a uma média da actividade medular dos últimos 20-120 dias e marcador de eritropoiese com restrição de ferro.<sup>121</sup> A análise integrada dos valores do *sTfR index* e CHr permite dividir os doentes em quatro categorias funcionais, permitindo distinguir doentes com défices quantitativos de ferro e eritropoiese com deficiência de ferro daqueles repletos de ferro mas com um défice funcional de ferro que tem como consequência diminuída hemoglobinação.<sup>122</sup>

Desta forma consegue-se detectar as mudanças mais precoces nos índices eritrocitários que indiquem o desenvolvimento de eritropoiese ferro-deficiente<sup>121</sup>, o que pode ainda ter auxiliar a decidir se a suplementação de ferro pode ter impacto nos níveis de hemoglobina do doente, individualmente.<sup>109</sup>

O papel central que a hepcidina desempenha no desenvolvimento da anemia da doença crónica torna o seu doseamento um alvo preferencial para o diagnóstico e avaliação da mesma. Foram desenvolvidos métodos para o doseamento de hepcidina que dependiam da sua concentração na urina e eram laboriosos,<sup>33</sup> mas mais recentemente métodos imunológicos que detectam as concentrações de hepcidina no soro foram desenvolvidos, com potencial utilidade para a clínica.<sup>123</sup>

No entanto, os níveis de hepcidina podem não estar aumentados quando co-existem anemia da doença crónica e anemia por deficiência de ferro uma vez que a elevação dos mesmos induzida pela inflamação pode ser contrabalançada pelos efeitos inibitórios da deficiência de ferro.<sup>109</sup> Num estudo efectuado por Ferrucci et al os níveis de hepcidina correlacionaram-se com os marcadores dos níveis de ferro mas não com os marcadores inflamatórios, sugerindo vias alternativas que podem contribuir para hipoferrémia na anemia da doença crónica.<sup>57</sup> De facto, os efeitos a longo prazo da hepcidina podem condicionar deficiência de ferro, por diminuírem a sua absorção a nível intestinal, o que por sua vez pode diminuir a expressão da proteína de fase aguda.<sup>121</sup> Este facto foi também verificado por Theurl et al, que registou baixos níveis de hepcidina quando co-existem anemia da doença crónica e anemia por deficiência de ferro.<sup>124</sup> Mais tarde concluiu que a via de regulação da hepcidina induzidas por deficiência de ferro pode reverter os efeitos da via de regulação induzida pela inflamação.<sup>60</sup> Assim a interpretação do seu valor deve ser feita cuidadosamente, uma vez que um intervalo de referência globalmente aceite ou um cut-off validado para o diagnóstico de anemia da doença crónica e anemia por deficiência de ferro não foram ainda encontrados.<sup>125</sup> Os níveis de hepcidina podem assim ser mais úteis para distinguir quais os doentes com anemia da doença crónica não complicada por deficiência de ferro.

Um pequeno resumo do uso das investigações laboratoriais actualmente disponíveis para o diagnóstico diferencial de anemia da doença crónica encontra-se na tabela 4.

**Tabela 4. Resumo do uso de investigações laboratoriais no diagnóstico diferencial de ADC**

	DF sem Anemia	ADF	ADC	ADC+ADF
<b>Nível Hb</b>	Normal	Baixo	Baixo	Baixo
<b>Marcadores Inflamatórios</b>	Negativo	Negativo	Aumentado	Aumentado
<b>Ferritina</b>	Baixo	Baixo	Normal/ Aumentado	Normal
<b>Saturação de Transferrina</b>	Baixo	Baixo	Baixo	Baixo
<b>Índice sTfR</b>	Aumentado	Aumentado	Baixo	Aumentado
<b>Hepcidina Sérica</b>	Baixo	Baixo	Aumentado	Normal
<b>GDF 15</b>	Normal	Normal	Aumentado	Aumentado

Hb – hemoglobina; sTfR – receptor da transferrina solúvel; GDF15 – factor 15 de diferenciação de crescimento; DF – deficiência de ferro; ADF – anemia por deficiência de ferro; ADC – anemia da doença crónica.

(Adaptado de Cullis JO. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. <sup>108</sup>)

## **TRATAMENTO**

Geralmente, em doentes com anemia da doença crônica, o hematócrito ronda os 30% e a concentração de hemoglobina não é inferior a 10g/dL, uma vez que a anemia se desenvolve lentamente, o organismo adapta-se e os doentes lidam bem com esta comorbilidade. No entanto, doentes com insuficiência cardíaca têm mais dificuldade em tolerar estados anémicos, podendo desenvolver sintomatologia mesmo com níveis de hematócrito superiores.<sup>99</sup> Assim perfila-se de suma importância conhecer que opções terapêuticas existem para o tratamento da anemia da doença crônica nestes doentes e que estratégias utilizar. Serão ainda sumariamente abordadas que estratégias poderão estar disponíveis num futuro próximo.

## **TRANSFUSÕES SANGUÍNEAS**

As transfusões sanguíneas são um meio simples de tratar doentes com anemias moderadas a severas. No entanto, o sangue é um recurso findável e acarreta riscos a longo-termo de transmissão viral, sobrecarga de ferro e aloimunização.<sup>109</sup> Em doentes com anemia da doença crônica a transfusão deve ser reservada para doentes com anemia severa, ameaçadora da vida.

## **SUPLEMENTAÇÃO DE FERRO**

Nanas et al relatou que 73% dos doentes com insuficiência cardíaca e anemia, apesar de ferro sérico, ferritina e função renal normais, apresentam, após estudo do aspirado de medula óssea, depleção das reservas de ferro.<sup>112</sup> Esta deficiência de ferro



pode ser consequência de defeitos na absorção do mesmo, para além de diminuída disponibilidade do ferro reciclado pelo sistema reticuloendotelial.<sup>41</sup> Apenas recentemente se começou a pensar na anemia por deficiência de ferro como o resultado final de um processo gradual e contínuo de depleção das reservas de ferro,<sup>126</sup> não estando o aparecimento das suas consequências clínicas restrito ao desenvolvimento de anemia.<sup>127</sup> e não devendo estar o início do tratamento restrito a essa fase.

O reconhecimento do desenvolvimento de uma deficiência funcional de ferro na patogénese da anemia da doença crónica contribuiu para a reavaliação do uso de suplementação de ferro no tratamento desta patologia. Para além dos benefícios que a suplementação de ferro apresenta em doentes com anemia por deficiência de ferro e anemia da doença crónica concomitantemente, esta pode ser benéfica mesmo no tratamento de doentes com anemia da doença crónica “pura”.<sup>121</sup>

O tratamento de doentes insuficientes cardíacos sintomáticos com índices anormais do metabolismo do ferro através da administração de ferro intravenoso melhora parâmetros como os scores funcionais NYHA, 6MWD e Qualidade de Vida, em doentes com e sem anemia, sem o desenvolvimento de efeitos secundários significativos.<sup>126,128</sup> Este está associado com melhorias significativas na capacidade máxima de exercício, quantificado pela pVO<sub>2</sub>/kg, parâmetro que não apresenta correlação com as concentrações de hemoglobina, mas sim com aumentos na saturação de transferrina. Estes benefícios funcionais foram acompanhados de melhorias a nível sintomático e no metabolismo do ferro, apesar de poucas alterações nos valores de hemoglobina,<sup>126</sup> e de diminuições dos níveis de NT-proBNP.<sup>129</sup> Assim, é também lícito inferir que a resolução da anemia não é a única razão para a melhoria verificada nos insuficientes cardíacos, o que corrobora a hipótese de que a depleção de ferro por si só pode atenuar a tolerância ao exercício aeróbico e causar fadiga,<sup>130</sup> e que,

contrariamente ao que se pensava, a deficiência de ferro pode ser o alvo terapêutico mais relevante, ao invés da anemia já estabelecida.

Nos estudos mencionados não se reporta um significativo aumento na ocorrência de infecções e eventos neurológicos ou cardíacos, não obliterando no entanto a necessidade de estudos com maior população para poder detectar efeitos adversos raros. Fica ainda patente a necessidade de estudos mais alargados no tempo para avaliar o impacto deste tratamento a longo prazo, a nível de mortalidade e hospitalizações, apesar de já mencionado o pior prognóstico que o desenvolvimento de anemia acarreta nos doentes.

A ausência de avaliação de preparações orais no tratamento da anemia destes doentes torna-se uma limitação. Ferro oral é mais barato e de mais fácil administração, no entanto apresenta reduzida compliance por parte dos doentes por ser mal tolerado.<sup>131</sup> No entanto, a absorção de ferro em doentes com anemia da doença crónica pode estar comprometida devido à sobre-expressão de hepcidina, que bloqueia a sua absorção a nível intestinal, daí que os ensaios clínicos até agora tenham apenas usado soluções intravenosas de ferro.<sup>131</sup> Foram utilizadas preparações de sacarose de ferro<sup>126,129</sup> e carboximaltose férrica<sup>128</sup>, tendo ambas apresentado resultados semelhantes, sendo sugerido um efeito de classe. Não é ainda clara a forma como a suplementação intravenosa de ferro ultrapassa a barreira do bloqueio reticuloendotelial, mas é possível que o ferro infundido se ligue directamente à transferrina ao invés de ser capturado pelos macrófagos, não havendo, no entanto, dados *in vitro* que suportem esta hipótese.<sup>109</sup> A sua utilização não é isenta de riscos, no entanto, as preparações mais recentes apresentam melhores perfis de segurança e nos estudos mencionados não foi reportada significativa incidência de efeitos adversos.

Não existem, por enquanto, guidelines para o tratamento da anemia em doentes insuficientes cardíacos, ou tão pouco valores-alvo a atingir.

### **AGENTES ESTIMULANTES DA ERITROPOIESE**

A razão para o uso de Agentes Estimulantes da Eritropoiese (AEE) em contexto de anemia da doença crónica baseia-se no facto de, como já mencionado, se verificar nestes doentes níveis séricos de Epo inferiores ao que seria de esperar tendo em conta o grau de anemia, e no facto de se verificar reduzida sensibilidade dos precursores eritróides a Epo endógena, ou seja, destes doentes necessitarem de maiores concentrações de Epo em comparação com indivíduos saudáveis para se obter o mesmo efeito. Estes agentes têm sido propostos como uma possível abordagem terapêutica para a correcção da anemia que se desenvolve em doentes com insuficiência cardíaca, uma vez que em doentes com insuficiência renal crónica apresentam bons resultados a aumentar as concentrações de hemoglobina, não havendo, no entanto, mesmo nestes, evidência de extensa melhoria do prognóstico.<sup>132</sup>

Cleland et al. demonstrou que a darbepoetina alfa (DA), um agente eritropoiético de longa acção, produziu um aumento sustentado dos níveis de hemoglobina em doentes insuficientes cardíacos com anemia, registando ainda um perfil farmacocinético semelhante ao encontrado em indivíduos saudáveis, não tendo sido descritos efeitos adversos severos.<sup>133</sup> Desde então surgiram três estudos de fase II, randomizados e controlados com placebo, para avaliar o tratamento da anemia da insuficiência cardíaca com este agente.<sup>134-136</sup> Em todos estes estudos foi dada suplementação oral de ferro, muito embora, à luz dos conhecimentos mais actuais, a sua eficácia nestes doentes possa ser discutida. Após análise dos dois maiores estudos, foi encontrada uma tendência à

diminuição do número de hospitalizações e mortes nos doentes tratados com DA, tanto maior quanto maior o aumento dos níveis de hemoglobina em relação ao nível basal.<sup>137</sup>

O tratamento com DA aumentou gradualmente a concentração média de hemoglobina, o que não se verificou nos doentes tratados com placebo, tendo no primeiro grupo sido atingidos os níveis-alvo de hemoglobina em 75% dos doentes, à semana 27 de estudo, contrastando com os apenas 10% do grupo de controlo.<sup>137</sup> Não foi demonstrada uma diminuição significativa de eventos adversos entre o grupo de controlo e o grupo submetido a tratamento, podendo esta falta de relevância estatística dever-se ao pequeno tamanho da amostra ou duração do follow-up dos doentes.

Apesar de não ser ainda clara a utilidade do tratamento dos doentes insuficientes cardíacos com anemia da doença crónica utilizando AEE, têm sido relatados mecanismos da DA que vão além da correcção da anemia, como a diminuição do fenómeno de apoptose ou melhoria da capacidade de perfusão periférica.<sup>138</sup>

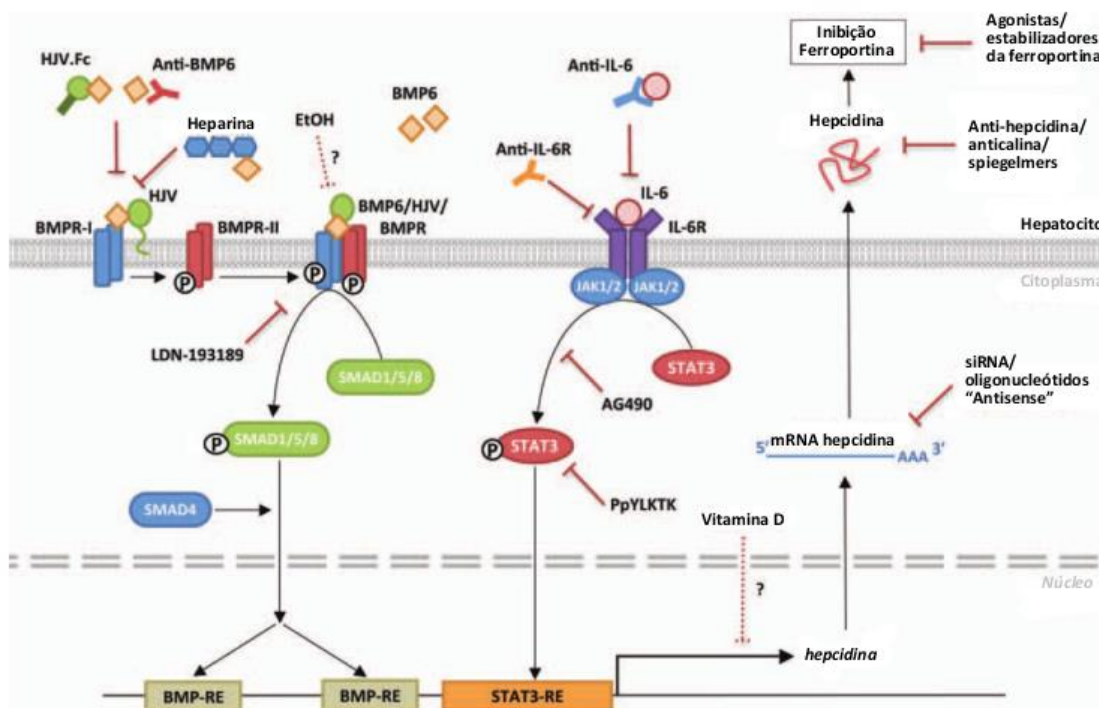
Mais recentemente tem-se levantado questões em relação a possíveis efeitos deletérios da administração de EPO exógena em doentes com anemia da doença crónica, especialmente em termos de risco cardiovascular e trombótico. O estudo CHOIR (“Correction of Haemoglobin and Outcomes in Renal Insufficiency”) demonstrou que tentar atingir uma concentração de hemoglobina superior a 13,5g/dL aumentava o risco cardiovascular mas não a qualidade de vida, quando comparado com concentrações-alvo de 11,3g/dL.<sup>139</sup> O mesmo foi demonstrado em estudos de índole semelhante,<sup>140,141</sup> não sendo no entanto estes resultados transversais a todas as publicações, uma vez que no estudo de Klapholz et al. não foi demonstrada evidência de risco aumentado de mortalidade ou eventos cardiovasculares relacionados com o fármaco nos doentes tratados com DA.<sup>142</sup>

As descobertas das análises mais recentes levaram à criação de um estudo em larga escala, já em fase III, o RED-HF (“Reduction of Events with Darbepoetin alfa in Heart Failure”),<sup>132</sup> que visa determinar definitivamente o efeito da DA na mortalidade, morbidade e qualidade de vida em doentes com insuficiência cardíaca e anemia, cujas conclusões ainda não são conhecidas.

### **AGENTES ESTIMULANTES DA ERITROPOIESE ASSOCIADOS A SUPLEMENTAÇÃO DE FERRO**

O uso de AEE e suplementação intravenosa de ferro concomitantemente revelou em vários estudos uma marcada melhoria na função cardíaca dos doentes e na sua capacidade funcional, bem como demonstrou diminuir as hospitalizações, acometimento renal e necessidade de diuréticos.<sup>101,102</sup> No entanto estes estudos são mais antigos e à luz do conhecimento actual e após análise de trabalhos recentes, é lícito teorizar que estes resultados se tenham obtido por uma acção mais preponderante da suplementação de ferro que propriamente pelo uso de AEE. Nos estudos mais recentes com vista a determinar o efeito dos AEE, a suplementação de ferro tem sido administrada pela via oral, não tendo estes estudos obtido os melhores resultados. Mais estudos são necessários nesta área, com vista a tirar ilações sobre qual a melhor estratégia de tratamento nos doentes insuficientes cardíacos com anemia.

**DIRECÇÕES FUTURAS POSSÍVEIS**



**Figura 4. Inibidores que atacam o eixo hepcidina-ferroportina são potenciais avenidas terapêuticas para o tratamento da anemia da doença crónica.** Uma vez que a sobreexpressão de hepcidina causa ADC o bloqueio das vias de sinalização responsáveis pela sua síntese pode atenuar o desenvolvimento de anemia. O mecanismo através do qual a vitamina D actua neste sentido não foi ainda esclarecido.

(Adaptado de Sun CC et al. Targeting the hepcidin–ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation <sup>33</sup>)

Terapias alternativas que visam o eixo hepcidina-ferroportina são opções terapêuticas atractivas, uma vez que diminuindo a expressão de hepcidina e aumentando a de ferroportina, a biodisponibilidade do ferro absorvido da alimentação aumenta, bem como seria favorecida a mobilização do ferro armazenado no sistema reticuloendotelial, teoricamente sem os efeitos adversos que a administração suprafisiológica de ferro ou de agentes estimuladores da eritropoiese acarretariam. Várias estratégias de inibir a

função da hepcidina – antagonistas directos da hepcidina, prevenir a transcrição da hepcidina – inibidores da produção da hepcidina, ou promover a resistência da ferroportina à acção da hepcidina – agonistas/estabilizadores da ferroportina, estão actualmente sob investigação.<sup>34</sup>

A supressão directa da actividade da hepcidina pode ser feita com recurso a anticorpos anti-hepcidina,<sup>143</sup> ou *RNA curto de interferência e oligonucleotídeos antisense contra a hepcidina* (short interference RNA and antisense oligonucleotides against hepcidina);<sup>109</sup> pode suprimir-se indirectamente a sua acção inibindo a via de sinalização da BMP<sup>65,144</sup>, com recurso a *dorsomorfin*a ou mesmo com recurso a heparina, de uma forma dose-dependente.<sup>145</sup> O recurso a anticorpos anti-receptor da IL-6, ou o recurso a *pentoxifilina*, um fármaco com propriedades anti-inflamatórias, são estratégias que estão ainda em desenvolvimento, com o intuito de diminuir a intensidade do ambiente pró-inflamatório que leva ao desenvolvimento de anemia da doença crónica (Figura 4).<sup>109</sup>

## CONCLUSÃO

A anemia da doença crónica é uma patologia muito frequente no contexto da insuficiência cardíaca, sendo frequentemente subreconhecida, subdiagnosticada e subtratada, principalmente nos idosos. O seu impacto no prognóstico destes doentes é vasto, podendo, por um lado, desempenhar um papel na progressão da insuficiência cardíaca e, por outro, condicionar incapacidade funcional e decréscimo nos níveis de qualidade de vida destes doentes. O reconhecimento de que a anemia é a ponta final de um espectro que se inicia numa incapacidade não absoluta, mas funcional, de ferro, é um conceito importante na medida em que repondo as reservas de ferro destes indivíduos se consegue aumentar a sua tolerância à realização de actividades físicas no seu dia-a-dia e conseqüentemente melhorar a sua qualidade de vida. Para isso, é necessária a introdução na prática clínica de novas ferramentas diagnósticas que têm vindo a ser desenvolvidas com o intuito de permitir aos Médicos a detecção de distúrbios na homeostasia do ferro e/ou desenvolvimento de anemia em fases precoces. A determinação dos níveis séricos de sTfR, do índice de sTfR ou da CHr tem indubitável valor no diagnóstico diferencial entre ADC, ADF e ADC/ADF concomitantemente. Impõe-se também a edificação de modelos de predição do prognóstico dos indivíduos com insuficiência cardíaca que tenham em conta o valor de RDW, um marcador independente com vantagens a nível da capacidade preditiva, acessibilidade e custos de determinação.

Com o conhecimento crescente sobre a etiofisiopatologia da anemia da doença crónica e do desenvolvimento desta complicação em insuficientes cardíacos, estão actualmente a decorrer ensaios clínicos em fases avançadas que visam determinar o impacto da prevenção do desenvolvimento de anemia franca, do seu tratamento precoce



e que metas terapêuticas devem ser almeçadas. Novas abordagens terapêuticas estão também em estudo. É esperado que num futuro próximo o Clínico tenha um maior domínio e compreensão desta patologia, novas ferramentas diagnósticas e um melhorado arsenal terapêutico para debelar ou minimizar o seu impacto nos indivíduos com doenças crônicas, nomeadamente a insuficiência cardíaca.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Professor Doutor Manuel Teixeira Marques Veríssimo, um especial agradecimento pelo interesse, dedicação e disponibilidade demonstrados, contribuição sem a qual não teria sido possível a elaboração deste trabalho.

Aos meus pais, Ana Paula e Francisco, os meus exemplos, e ao meu irmão, João Pedro, um sentido obrigado pelo carinho, apoio, paciência e constantes orientações e presença na minha vida.

À Mafalda e também aos meus amigos, agradeço os conselhos, a preocupação e a disponibilidade que sempre demonstraram.

## BIBLIOGRAFIA

1. Oster HS, Benderly M, Hoffman M, Cohen E, Shotan A, Mittelman M.; Mortality in Heart Failure with Worsening Anemia: A National Study. *Israel Med Ass J* 2013; 15: 368–372
2. Go AS, Mozaffarian D, Roger VL, Benjamin EJ, Berry JD, Borden WB, et al. Heart disease and stroke statistics - 2013 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 2013; 127(1):e6–e245.
3. Anand IS. Anemia and Chronic Heart Failure. Implications and Treatment Options. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52(7):501–11.
4. Weiss G, Goodnough LT. Anemia of chronic disease. *N Engl J Med* 2005; 352(10):1011–23.
5. Petrosyan I, Blaison G, Andrès E, Federici L. Anaemia in the elderly: an aetiologic profile of a prospective cohort of 95 hospitalised patients. *Eur J Intern Med* 2012; 23(6):524–8.
6. Weiss G. Iron metabolism in the anemia of chronic disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1790(7):682–93.
7. Roy CN. Anemia of Inflammation. *Hematology* 2010; 276–80.
8. Mccord JM. Free Radicals: The Pros and Cons of Antioxidants, Iron, Free Radicals and Oxidative Injury; *The Journal of Nutrition* 2004; 3171–2.
9. Muckenthaler MU. Fine tuning of hepcidin expression by positive and negative regulators. *Cell Metab* 2008; 8(1):1–3.
10. Camaschella C. Iron and hepcidin: a story of recycling and balance. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2013; 2013:1–8.
11. Ohgami RS, Campagna DR, Greer EL, Antiochos B, Chen J, Sharp JJ, et al. Identification of a ferrireductase required for efficient transferrin-dependent iron uptake in erythroid cells. *Nat Genet* 2007; 37(11):1264–9.
12. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *J Immunol* 2002; 169(4):2204–9.
13. Infusino I, Braga F, Dolci A, Panteghini M. Soluble transferrin receptor (sTfR) and sTfR/log ferritin index for the diagnosis of iron-deficiency anemia. A meta-analysis. *Am J Clin Pathol* 2012; 138(5):642–9.

14. Kakhlon O, Cabantchik ZI. Labile Iron Pool: characterization, measurement and participation in cellular processes. *Free Rad Biol and Med* 2002; 33(8):1037–46.
15. McKie AT, Marciani P, Rolfs A, Brennan K, Wehr K, Barrow D, et al. A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol Cell* 2000; 5(2):299–309.
16. Yang F, Liu X-B, Quinones M, Melby PC, Ghio A, Haile DJ. Regulation of reticuloendothelial iron transporter MTP1 (Slc11a3) by inflammation. *J Biol Chem* 2002; 277(42):39786–91.
17. Knutson MD, Vafa MR, Haile DJ, Wessling-Resnick M. Iron loading and erythrophagocytosis increase ferroportin 1 (FPN1) expression in J774 macrophages. *Blood [Internet]* 2003 [cited 2013 Aug 18];102(12):4191–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12907459>
18. Knutson MD, Oukka M, Koss LM, Aydemir F, Wessling-Resnick M. Iron release from macrophages after erythrophagocytosis is up-regulated by ferroportin 1 overexpression and down-regulated by hepcidin. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102(5):1324–8.
19. Delaby C, Pilard N, Puy H, Canonne-Hergaux F. Sequential regulation of ferroportin expression after erythrophagocytosis in murine macrophages: early mRNA induction by haem, followed by iron-dependent protein expression. *Biochem J* 2008; 411(1):123–31.
20. Fisher J, Devraj K, Ingram J, Madhankumar AB, Liu X, Simpson IA, et al. Ferritin: a novel mechanism for delivery of iron to the brain and other organs. *Am. J. Cell Physiol* 2007;
21. Li L, Fang CJ, Ryan JC, Niemi EC, Lebrón J a, Björkman PJ, et al. Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1. *Proc Natl Acad Sci* 2010;107(8):3505–10.
22. Leimberg MJ, Prus E, Konijn AM, Fibach E. Macrophages function as a ferritin iron source for cultured human erythroid precursors. *J Cell Biochem* 2008; 103(4):1211–8.
23. Kanyshkova TG, Babina SE, Semenov D V., Isaeva N, Vlassov A V., Neustroev KN, et al. Multiple enzymic activities of human milk lactoferrin. *Eur J Biochem* 2003;270(16):3353–61.
24. González-Chávez S, Arévalo-Gallegos S, Rascón-Cruz Q. Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(4):301.e1–8.
25. Moller HJ. Identification of the hemoglobin scavenger receptor/CD163 as a natural soluble protein in plasma. *Blood* 2002; 99(1):378–80.

26. Zoller EE, Lykens JE, Terrell CE, Aliberti J, Filipovich AH, Henson PM, et al. Hemophagocytosis causes a consumptive anemia of inflammation. *The Journal of experimental medicine* 2011; 208(6):1203–14.
27. Nemeth E, Tuttle MS, Powelson J, Vaughn MB, Donovan A, Ward DM, et al. Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science* 2004; 306(5704):2090–3.
28. Ganz T. Heparin and iron regulation, 10 years later. *Blood* 2011;117(17):4425–33.
29. Andrews NC. Anemia of inflammation: the cytokine-heparin link. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 113(9).
30. Delaby C, Pilard N, Gonçalves AS, Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Presence of the iron exporter ferroportin at the plasma membrane of macrophages is enhanced by iron loading and down-regulated by heparin. *Blood* 2005; 106(12):3979–84.
31. Nemeth E, Valore E V, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, Ganz T. Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; 101(7):2461–3.
32. Kemna E, Pickkers P, Nemeth E, van der Hoeven H, Swinkels D. Time-course analysis of heparin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood* 2005; 106(5):1864–6.
33. Nemeth E, Rivera S, Gabayan V, Keller C, Taudorf S, Pedersen BK, et al. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone heparin. *Journal of Clinical Investigation* 2004; 113(9):1271–6
34. Sun CC, Vaja V, Babitt JL, Lin HY. Critical Review: Targeting the heparin – ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation. *J Med Cases* 2012; 392–400
35. Lijian Wang, M.D., Sc.D., Estela Trebicka, B.S., Ying Fu, M.D., Ph.D. SE, M.Sc., N.D., Charles C. Hong, M.D., Ph.D, Jodie L. Babitt, M.D., Herbert Y. Lin MD, Ph.D., and Bobby J. Cherayil MD. The bone morphogenetic protein-heparin axis as a therapeutic target in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2012; 18(1):112–9
36. Wang R-H, Li C, Xu X, Zheng Y, Xiao C, Zerfas P, et al. A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of heparin expression. *Cell Metab* 2005; 2(6):399–409

37. Pereira CA, Roscani MG, Zanati SG, Matsubara BB. Review Article Anemia, Heart Failure and Evidence-Based Clinical Management. 2012; 87–92
38. Koury MJ, Ponka P. New insights into erythropoiesis: the roles of folate, vitamin B12, and iron. *Annu Rev Nutr* 2004; 24:105–31
39. Okonko DO, Marley SB, Anker SD, Poole-Wilson P a, Gordon MY. Suppression of erythropoiesis in patients with chronic heart failure and anaemia of unknown origin: evidence of an immune basis. *Int J Cardiol* 2013; 166(3):664–71
40. Ezekowitz JA, Mcalister FA, Armstrong PW. Brief Rapid Communications: Anemia is Common in Heart Failure and is Associated with Poor Outcomes; Insights from a cohort of 12065 patients with new-onset heart failure. *Circulation* 2003; 107:223–5
41. Opasich C, Cazzola M, Scelsi L, De Feo S, Bosimini E, Lagioia R, et al. Blunted erythropoietin production and defective iron supply for erythropoiesis as major causes of anaemia in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2005; 26(21):2232–7
42. Okonko D., Mandal AKJ, Missouriis CG, Poole-Wilson PA, Disordered Iron Homeostasis in Chronic Heart Failure; Prevalence, Predictors, and Relation to Anemia, Exercise Capacity, and Survival. *J Am Coll Card* 2011; 58(12):1241–51
43. Martínez-Ruiz a, Tornel-Osorio PL, Sánchez-Más J, Pérez-Fornieles J, Vílchez J a, Martínez-Hernández P, et al. Soluble TNF $\alpha$  receptor type I and hepcidin as determinants of development of anemia in the long-term follow-up of heart failure patients. *Clin Biochem* 2012;45(16-17):1455–8
44. Okonko DO. Anemia in chronic heart failure. *J Card Fail* 2004; 10(1):S5-S9
45. Weiss G. Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. *Blood Rev* 2002; 16(2):87–96
46. Chatterjee B, Nydegger UE, Mohacsi P. Serum erythropoietin in heart failure patients treated with ACE-inhibitors or AT(1) antagonists. *Eur J Heart Fail* 2000; 2(4):393–8
47. Westenbrink BD, Voors A a, de Boer R a, Schuringa JJ, Klinkenberg T, van der Harst P, et al. Bone marrow dysfunction in chronic heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2010; 12(7):676–84
48. Sharma R, Anker SD. Cytokines, apoptosis and cachexia: the potential for TNF antagonism. *Int J Cardiol* 2002; 85(1):161–71

49. Van der Meer P, Lok DJ, Januzzi JL, de la Porte PWB-A, Lipsic E, van Wijngaarden J, et al. Adequacy of endogenous erythropoietin levels and mortality in anaemic heart failure patients. *Eur Heart J* 2008; 29(12):1510–5
50. Theurl I, Mattle V, Seifert M, Mariani M, Marth C, Weiss G. Dysregulated monocyte iron homeostasis and erythropoietin formation in patients with anemia of chronic disease. *Blood* 2006; 107(10):4142–8
51. Means R, Krantz S. Inhibition of human erythroid colony-forming units by gamma interferon can be corrected by recombinant human erythropoietin. *Blood* 1991;78:2564–7
52. Raj DSC. Role of interleukin-6 in the anemia of chronic disease. *Semin Arthritis Rheum* 2009; 38(5):382–8
53. Tilg H, Ulmer H, Kaser A, Weiss G. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *J Immunol* 2002; 169(4):2204–9
54. Iversen PO, Woldbaek PR, Tønnessen T, Christensen G, Smith DH, Thorp ML, et al. Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure. *Am J Physiol Reg Int Comp Physiol* 2012; 282:166-172
55. Ruifrok WT, Qian C, Silljé HHW, Goor H Van. Heart failure-associated anemia : bone marrow dysfunction and response to erythropoietin. *J Mol Med* 2011; 89:377–87
56. Buck I, Morceau F, Grigorakaki C, Dicato M, Diederich M. Linking anemia to inflammation and cancer: the crucial role of TNFalpha. *Biochem Pharmacol* 2009; 77(10):1572–9
57. Ferrucci L, Semba RD, Guralnik JM, Ershler WB, Bandinelli S, Patel K V, et al. Proinflammatory state, hepcidin, and anemia in older persons. *Blood* 2010; 115(18):3810–6
58. Nemeth E, Ganz T. The role of hepcidin in iron metabolism. *Acta Haematol* 2009; 122(2-3):78–86
59. Ganz T. Hepcidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood* 2003; 102(3):783–8
60. Theurl I, Schroll A, Nairz M, Seifert M, Theurl M, Sonnweber T, et al. Pathways for the regulation of hepcidin expression in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in vivo. *Haematologica* 2011; 96(12):1761–9

61. Divakaran V, Mehta S, Yao D, Hassan S, Simpson S, Wiegerinck E, et al. Hepcidin in anemia of chronic heart failure. *Am J Hematol* 2011; 86(1):107–9
62. Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, Naito Y, Akahori H, Sakoda T, et al. Iron Regulatory Hormone Hepcidin Decreases in Chronic Heart Failure Patients With Anemia. *Circ J* 2010; 74(2):301–6
63. Tamary H, Shalev H, Perez-Avraham G, Zoldan M, Levi I, Swinkels DW, et al. Elevated growth differentiation factor 15 expression in patients with congenital dyserythropoietic anemia type I. *Blood* 2008; 112(13):5241–4
64. Prince OD, Langdon JM, Layman AJ, Prince IC, Sabogal M, Mak HH, et al. Late stage erythroid precursor production is impaired in mice with chronic inflammation. *Haematologica* 2012; 97(11):1648–56
65. Steinbicker AU, Sachidanandan C, Vonner AJ, Yusuf RZ, Deng DY, Lai CS, et al. Inhibition of bone morphogenetic protein signaling attenuates anemia associated with inflammation. *Blood* 2011; 117(18):4915–23
66. Cromie N, Lee C, Struthers a D. Anaemia in chronic heart failure: what is its frequency in the UK and its underlying causes? *Heart* 2002;87(4):377–8
67. Gheorghide M, Zannad F, Sopko G, Klein L, Piña IL, Konstam M a, et al. Acute heart failure syndromes: current state and framework for future research. *Circulation* 2005; 112(25):3958–68
68. Pocock SJ, Wang D, Pfeffer MA, Yusuf S, McMurray JJV, Swedberg KB, et al. Predictors of mortality and morbidity in patients with chronic heart failure. *Eur Heart J* 2006; 27(1):65–75
69. Felker G, Allen L et al. Red Cell Distribution Width as a Novel Prognostic Marker in Heart Failure; Data From the CHARM Program and the Duke Databank. *J Am Coll Card* 2007; 50(1):40–7
70. Pascual-Figal D a, Bonaque JC, Redondo B, Caro C, Manzano-Fernandez S, Sánchez-Mas J, et al. Red blood cell distribution width predicts long-term outcome regardless of anaemia status in acute heart failure patients. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(9):840–6
71. Van Kimmenade RRJ, Mohammed A a, Uthamalingam S, van der Meer P, Felker GM, Januzzi JL. Red blood cell distribution width and 1-year mortality in acute heart failure. *Eur J Heart Fail* 2010; 12(2):129–36



72. Allen L, Felker GM, Mehra MR, Chiong JR, Dunlap SH, Ghali JK, et al. Validation and potential mechanisms of red cell distribution width as a prognostic marker in heart failure. *J Card Fail* 2010; 16(3):230–8
73. FöhrhécZ Z, Gombos T, Borgulya G, Pozsonyi Z, Prohászka Z, Jánoskúti L. Red cell distribution width in heart failure: prediction of clinical events and relationship with markers of ineffective erythropoiesis, inflammation, renal function, and nutritional state. *Am Heart J* 2009; 158(4):659–66
74. Emans ME, Gaillard C a JM, Pfister R, Tanck MW, Boekholdt SM, Wareham NJ, et al. Red cell distribution width is associated with physical inactivity and heart failure, independent of established risk factors, inflammation or iron metabolism; the EPIC-Norfolk study. *Int J Cardiol* 2013
75. Agarwal S. Red cell distribution width, inflammatory markers and cardiorespiratory fitness: results from the National Health and Nutrition Examination Survey. *Indian Heart J* 2012 ; 64(4):380–7.
76. Pascual-Figal DA, Bonaque JC, Manzano-Fernández S, Fernández A, Garrido IP, Pastor-Perez F, et al. Red blood cell distribution width predicts new-onset anemia in heart failure patients. *Int J Cardiol* 2012; 160(3):196–200.
77. Bonaque JC, Pascual-figal DA, Manzano-Fernández S, Vidal A, Mun C, Garrido IP, et al. Red Blood Cell Distribution Width Adds Prognostic Value for Outpatients With Chronic Heart Failure. 2012; 65(7):606–12.
78. Makhoul BF, Khourieh A, Kaplan M, Bahouth F, Aronson D, Azzam ZS. Relation between changes in red cell distribution width and clinical outcomes in acute decompensated heart failure. *Int J Cardiol* 2013; 167(4):1412–6. *Int J Cardiol* [Internet] 2013 [cited 2013 Sep 10];167(4):1412–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22560496>
79. Cauthen C a, Tong W, Jain A, Tang WHW. Progressive rise in red cell distribution width is associated with disease progression in ambulatory patients with chronic heart failure. *J Card Fail* 2012; 18(2):146–52.
80. Perlstein TS, Weuve J, Pfeffer MA, Beckman JA. Red blood cell distribution width and mortality risk in a community-based prospective cohort: NHANES III: RDW and mortality risk. *Arch Intern Med* 2009; 169(6):588–94.

81. Komajda M, Anker SD, Charlesworth A, Okonko D, Metra M, Di Lenarda A, et al. The impact of new onset anaemia on morbidity and mortality in chronic heart failure: results from COMET. *Eur Heart J* 2006; 27(12):1440–6.
82. Anand IS, Kuskowski MA, Rector TS, Florea VG, Glazer RD, Hester A, et al. Anemia and Change in Hemoglobin Over Time Related to Mortality and Morbidity in Patients With Chronic Heart Failure. *Circulation* 2005; 112:1121-1127
83. Berry JD, Willis B, Gupta S, Barlow CE, Lakoski SG, Khera A, Anand R, Lemos JÁ, Haskell W, Lloyd DM. Risks for Cardiovascular Disease Mortality by Cardiorespiratory Fitness Levels measured at age 45-, 55- e 65- years in men: The Cooper Center Longitudinal Study. *J Am Coll Cardiol* 2011; 57(15):1604–10
84. Cardiorespiratory Fitness as a Quantitative Predictor of All-Cause Mortality and Cardiovascular Events in Healthy Men and Women. *J Am Med Ass* 2009; 301(19)
85. Van Craenenbroeck EM, Pelle AJ, Beckers PJ, Possemiers NM, Ramakers C, Vrints CJ, et al. Red cell distribution width as a marker of impaired exercise tolerance in patients with chronic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2012; 14(1):54–60
86. Aung N, Ling HZ, Cheng AS, Aggarwal S, Flint J, Mendonca M, et al. Expansion of the red cell distribution width and evolving iron deficiency as predictors of poor outcome in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2013
87. Riva E, Tettamanti M, Mosconi P, Apolone G, Gandini F, Nobili A, et al. Association of mild anemia with hospitalization and mortality in the elderly: the Health and Anemia population-based study. *Haematologica* 2009; 94(1):22–8
88. Den Elzen WPJ, Willems JM, Westendorp RGJ, de Craen AJM, Assendelft WJJ, Gussekloo J. Effect of anemia and comorbidity on functional status and mortality in old age: results from the Leiden 85-plus Study. *CMAJ* 2009; 181(3-4):151–7
89. Anand IS, Kuskowski M a, Rector TS, Florea VG, Glazer RD, Hester A, et al. Anemia and change in hemoglobin over time related to mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: results from Val-HeFT. *Circulation* 2005; 112(8):1121–7
90. Kalogeropoulos A; Georgiopoulou V. Epidemiology of Incident Heart Failure in a Contemporary Elderly Cohort. 2009; *Arch Intern Med.* 2009; 169(7):708–15

91. Silverberg DS, Wexler D, Iaina A. The role of anemia in the progression of congestive heart failure. Is there a place for erythropoietin and intravenous iron? *J Nephrol* 2005; 17(6):749–61
92. Chaves PHM, Xue Q-L, Guralnik JM, Ferrucci L, Volpato S, Fried LP. What constitutes normal hemoglobin concentration in community-dwelling disabled older women? *J Am Geriatr Soc* 2004; 52(11):1811–6
93. Kikuchi M, Inagaki T, Shinagawa N. Five-Year Survival of Older People with Anemia: Variation with Hemoglobin Concentration. *J Am G Soc* 2001; 49:1226–8
94. Denny SD, Kuchibhatla MN, Cohen HJ. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. *Am J Med* 2006; 119(4):327–34
95. Penninx BWJH, Pahor M, Cesari M, Corsi AM, Woodman RC, Bandinelli S, et al. Anemia is associated with disability and decreased physical performance and muscle strength in the elderly. *J Am Geriatr Soc* 2004; 52(5):719–24
96. Balducci L. Anemia, fatigue and aging. *Transfus Clin Biol* 2010; 17(5-6):375–81
97. Sandgren PE, Murray AM, Herzog C a., Solid C a., Gilbertson DT, Collins AJ, et al. Anemia and New-Onset Congestive Heart Failure in the General Medicare Population. *J Card Fail* 2005; 11(2):99–105
98. Zeidman A, Fradin Z, Blecher A, Oster HS, Avrahami Y, Mittelman M. Anemia as a risk factor for ischemic heart disease. *Isr Med Assoc J* 2004; 6(1):16–8
99. Mayhew M. Anemia of Chronic Disease in the Elderly. *J Nurse Pract* 2006; 2(4):261–7
100. Sikole A, Polenakovic M, Spiroska V, Polenakovic B, Klinkmann H, Scigalla P. Recurrence of left ventricular hypertrophy following cessation of erythropoietin therapy. *Artif Organs* 2002; 26(2):98–102
101. Silverberg DS, Wexler D, Blum M, Keren G, Sheps D, Yachnin T, et al. The Use of Subcutaneous Erythropoietin and Intravenous Iron for the Treatment of the Anemia of Severe, Resistant Congestive Heart Failure Improves Cardiac and Renal Function and Functional Cardiac Class, and Markedly Reduces Hospitalizations. *J Am Coll Card* 2000;35(7)
102. Silverberg DS, Wexler D, Sheps D, Blum M, Keren G, Baruch R, et al. The effect of correction of mild anemia in severe, resistant congestive heart failure using subcutaneous erythropoietin and intravenous iron: A randomized controlled study. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37(7):1775–80

103. Willis MS, Lee ES, Grenache DG. Effect of anemia on plasma concentrations of NT-proBNP. *Clin Chim Acta* 2005; 358(1-2):175–81
104. Anand I, McMurray JJ V, Whitmore J, Warren M, Pham A, McCamish M a, et al. Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation* 2004; 110(2):149–54
105. Tanner H, Moschovitis G, Kuster GM, Hullin R, Pfiiffner D, Hess OM, et al. The prevalence of anemia in chronic heart failure. *Int J Cardiol* 2002; 86(1):115–21
106. Sharma R, Francis DP, Pitt B, Poole-Wilson PA, Coats AJS, Anker SD. Haemoglobin predicts survival in patients with chronic heart failure: a substudy of the ELITE II trial. *Eur Heart J* 2004; 25(12):1021–8
107. Chaves PHM, Ashar B, Guralnik JM, Fried P. Looking at the Relationship Between Hemoglobin Concentration and Prevalent Mobility Difficulty in Older Women. Should the Criteria Currently Used to Define Anemia in Older People be Reevaluated? 2002; 50(8):1257–64
108. Tanq WHW, Miller H, Partin M, Harris CM, Young JB. *JACC* 2003
109. Cullis JO. Diagnosis and management of anaemia of chronic disease: current status. *Br J Haematol* 2011; 154(3):289–300
110. Okonko D. Disordered Iron Homeostasis in Chronic Heart Failure Prevalence, Predictors, and Relation to Anemia, Exercise Capacity, and Survival. *J Am Coll Card* 2011; 58(12):1241–51
111. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia : diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009; 113:5277–86
112. Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D, Leonti A, Tsolakis E, Drakos SG, et al. Etiology of anemia in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2006; 48(12):2485–9
113. Kaldara-Papatheodorou EE, Terrovitis J V, Nanas JN. Anemia in heart failure: should we supplement iron in patients with chronic heart failure? *Pol Arch Med Wewn* 2010; 120(9):354–60
114. Skikne B, Punnonen K. Improved differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: a prospective multicenter evaluation of soluble transferrin receptor. *Am J Hemat* 2011; 86:923–7
115. Punnonen K, Irjala K, Rajamäki a. Serum transferrin receptor and its ratio to serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency. *Blood* 1997;89(3):1052–7

116. Karlsson T, Sjö F, Kedinge-Cyrus B, Bäckström B. Plasma soluble transferrin receptor assay when screening for iron-deficiency in an unselected population of elderly anaemic patients. *J Intern Med* 2010; 267(3):331–4
117. Lee EJ, Oh E-J, Park Y-J, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. *Clin Chem* 2002; 48(7):1118–21
118. Fitzsimons EJ, Houston T, Munro R, Sturrock RD, Speekenbrink ABJ, Brock JH. Erythroblast Iron Metabolism and Serum Soluble Transferrin Receptor Values in the Anemia of Rheumatoid Arthritis. 2002;47(2):166–71
119. Genc S, Erten N, Karan MA, Besisik SK, Saka B, Tascioglu C, et al. Soluble transferrin receptor and soluble transferrin receptor-ferritin index for evaluation of the iron status in elderly patients. *Tohoku J Exp Med* 2004; 202(2):135–42
120. Saboor M, Noreen A. Soluble Transferrin Receptor: A Differentiating Marker Between Iron Deficiency Anaemia And Anaemia of Chronic Disorders. 2011; 23(3):115–8
121. Goodnough LT, Nemeth E, Ganz T. Detection, evaluation, and management of iron-restricted erythropoiesis. *Blood* 2010;116(23):4754–61
122. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem* 2002; 48(7):1066–76
123. Ganz T, Olbina G, Girelli D, Nemeth E, Westerman M. Immunoassay for human serum hepcidin. *Blood* 2008; 112(10):4292–7
124. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications. *Blood* 2009; 113(21):5277–86
125. Geerts I, Vermeersch P, Joosten E. Evaluation of the first commercial hepcidin ELISA for the differential diagnosis of anemia of chronic disease and iron deficiency anemia in hospitalized geriatric patients. *ISRN Hematol* 2012; 2012:567491
126. Okonko D, Grzeslo A. Effect of Intravenous Iron Sucrose on Exercise Tolerance in Anemic and Nonanemic Patients With Symptomatic Chronic Heart Failure and Iron. *J Am Coll Card* 2008; 15(4):208

127. Beard JL. Iron Biology in Immune Function, Muscle Metabolism and Neuronal Functioning. *J Nut* 2001; 131:568–80
128. Anker SD, Filippatos G, Willenheimer R, Lüscher TF, Bart B, Banasiak W et al. Ferric Carboxymaltose in Patients with Heart Failure and Iron Deficiency. *N Engl J Med* 2009; 361:2436-48
129. Toblli JE, Lombraña A, Duarte P, Di Gennaro F. Intravenous iron reduces NT-pro-brain natriuretic peptide in anemic patients with chronic heart failure and renal insufficiency. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50(17):1657–65
130. Haas JD, Iv TB. Iron Deficiency and Reduced Work Capacity: A Critical Review of the Research to Determine a Causal Relationship. *Am Soc Nut Sci* 2001; 676–90
131. Avni T. Iron supplementation for the treatment of chronic heart failure and iron deficiency: systematic review and meta-analysis. *J Hear Fail* 2012; 14(4):423–9
132. McMurray JJ V, Anand IS, Diaz R, Maggioni a P, O'Connor C, Pfeffer M a, et al. Design of the reduction of events with darbepoetin alfa in heart failure (RED-HF): A phase III, anaemia correction, morbidity-mortality trial. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(8):795–801
133. Cleland JGF, Sullivan JT, Ball S, Horowitz JD, Agoram B, Rosser D, et al. Once-monthly administration of darbepoetin alfa for the treatment of patients with chronic heart failure and anemia: a pharmacokinetic and pharmacodynamic investigation. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46(2):155–61
134. Veldhuisen DJ, Dickstein K, Cohen-Solal a, Lok DJ, Wasserman SM, Baker N, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the effect of two dosing regimens of darbepoetin alfa in patients with heart failure and anaemia. *Eur Hear J* 2007; 28(18):2208–16
135. Ghali JK, Anand IS, Abraham WT, Fonarow GC, Greenberg B, Krum H, et al. Randomized double-blind trial of darbepoetin alfa in patients with symptomatic heart failure and anemia. *Circulation* 2008; 117(4):526–35
136. Ponikowski P, Anker SD, Szachniewicz J, Okonko D, Ledwidge M, Zymlinski R, et al. Effect of darbepoetin alfa on exercise tolerance in anemic patients with symptomatic chronic heart failure: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 2007; 49(7):753–62

137. Abraham WT, Anand IS, Klapholz M, Ponikowski P, Scarlata D, Wasserman SM, et al. Treatment of anemia with darbepoetin alfa in heart failure. *Congest Heart Fail* 2010; 16(3):87–95
138. Timmer S a J, De Boer K, Knaapen P, Götte MJW, Van Rossum a C. The potential role of erythropoietin in chronic heart failure: from the correction of anemia to improved perfusion and reduced apoptosis? *J Card Fail* 2009; 15(4):353–61
139. Singh AK, Szczech L, Tang KL, Barnhart H, Sapp S, Wolfson M, et al. Correction of anemia with epoetin alfa in chronic kidney disease. *N Engl J Med* 2006; 355(20):2085–98
140. Wright JR, Ung YC, Julian J a, Pritchard KI, Whelan TJ, Smith C, et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *J Clin Oncol* 2007; 25(9):1027–32
141. Pfeffer MA, Burdmann EA et al. A Trial of Darbepoetin Alfa in Type 2 Diabetes and Chronic Kidney Disease; *N Eng J Med* 2009; 361:2019–32
142. Klapholz M, Abraham WT, Ghali JK, Ponikowski P, Anker SD, Knusel B, et al. The safety and tolerability of darbepoetin alfa in patients with anaemia and symptomatic heart failure. *Eur J Heart Fail* 2009; 11(11):1071–7
143. Sasu BJ, Cooke KS, Arvedson TL, Plewa C, Ellison AR, Sheng J, et al. Antihepcidin antibody treatment modulates iron metabolism and is effective in a mouse model of inflammation-induced anemia. *Blood* 2010; 115(17):3616–24
144. Theurl I, Schroll A, Sonnweber T, Nairz M, Theurl M, Willenbacher W, et al. Pharmacologic inhibition of hepcidin expression reverses anemia of chronic inflammation in rats. *Blood* 2011; 118(18):4977–84
145. Poli M, Girelli D, Camprostrini N, Maccarinelli F, Finazzi D, Lusciati S, et al. Heparin: a potent inhibitor of hepcidin expression in vitro and in vivo. *Blood* 2011; 117(3):997–1004