

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul**

**Faculdade de Medicina**

**Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas**

**Patogênese da anemia em pacientes com insuficiência cardíaca:  
contribuição de mecanismos inflamatórios,  
peculiaridades do metabolismo do ferro e ação da eritropoetina**

Dissertação de Mestrado

Cristiane Seganfredo Weber

Orientadora: Nadine Clausell

Porto Alegre, Junho de 2010.

“A vida é uma peça de teatro que não permite ensaios. Por isso, cante, chore, dance, ria e viva intensamente, antes que a cortina se feche e a peça termine sem aplausos”.

*Charles Chaplin*

## AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) por terem me proporcionado o convívio com excelentes profissionais, durante toda minha formação acadêmica na graduação e agora durante a minha pós-graduação, o que vem me auxiliando na minha formação como uma profissional mais competente e qualificada.

Aos colegas do Serviço de Hematologia do HCPA e do laboratório do Hospital Mãe de Deus pela compreensão nos momentos que precisei me ausentar para me dedicar ao mestrado.

À equipe do laboratório de pesquisa cardiovascular em especial as biomédicas Carolina Cohen e Nidiane Martinelli que contribuíram muito para a realização do projeto através da dosagem dos kits elisa e auxílio na organização dos resultados.

Ao Grupo de Insuficiência Cardíaca, do qual tive a oportunidade de participar durante meus anos de acadêmica e que foi muito importante para minha formação como médica; pelo incentivo de todos para conclusão do trabalho e em especial a equipe de enfermagem pelo auxílio nas coletas das amostras dos pacientes.

Aos acadêmicos do Grupo de Insuficiência Cardíaca: Bruno Schneider, Stephan Soder, Andressa de Azeredo e Juliana Szymanski por terem disponibilizado seu tempo para ajuda na coleta dos dados dos pacientes do estudo.

À nutricionista Gabriela Souza por estar sempre transmitindo seu alto astral, por aguentar meus desabafos quando achei que não iria conseguir terminar essa longa caminhada e principalmente pelo auxílio na aquisição dos dados das ergoespirometrias do qual também participou a educadora física Paula Ribeiro.

À Dra. Lívia Goldraich, pela amizade, parceria, pelas conversas sobre a vida, o universo e tudo mais e por ter dedicado seu tempo livre entre um plantão e outro para me ajudar na realização das análises estatísticas, revisão dos dados e tradução/execução do artigo.

Ao meu co-orientador Prof. Luis Beck por todo auxílio prestado durante a execução deste projeto desde o início, durante sua elaboração, na análise dos dados, discussão dos dados e por ajudar a organizar melhor minhas idéias.

A minha orientadora, Prof<sup>a</sup> Nadine Clausell pelo exemplo de profissional capaz, dedicada, trabalhadora e incansável. Por ter sido exigente nos momentos necessários, por ter abdicado de alguns momentos de lazer para me ajudar nessa empreitada e por ter mostrado que posso ir além do que imaginava.

Aos meus avós Gino e Regina pelo seu exemplo como pessoas batalhadoras e honestas, pelos valores transmitidos, pelo seu apoio constante e pelas orações diárias para que eu conseguisse vencer mais essa etapa da minha vida.

Aos meus pais Bruno e Vera por sempre me incentivarem e acreditarem na minha capacidade e por tudo que me ensinaram e me ensinam até hoje.

As minhas irmãs Elisabete e Fernanda pelo carinho, amizade, apoio e pelos momentos de descontração que vocês, junto com o meu cunhado Augusto, me proporcionaram durante os momentos de estresse.

A todas as pessoas que durante a realização deste trabalho me disseram: Tudo vai dar certo!

E por fim, as maravilhas tecnológicas do mundo moderno sem as quais tudo teria sido bem mais difícil.

**LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS**

AcSDKP	N-acetil-seril-aspartil-lisina
AEE	Agentes estimuladores da eritropoese
AI	Anemia da inflamação
BNP	Peptídeo natriurético cerebral
DMT1	Transportador de metal divalente 1
DRC	Doença renal crônica
ECR	Ensaio clínico randomizado
EPO	Eritropoetina
Hb	Hemoglobina
HR	Hazard ratio
IC	Insuficiência cardíaca
iECA	Inibidores da enzima conversora da angiotensina
IL	Interleucina
KCCQ	Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire
MLHFQ	Minnesota living with Heart Failure Questionnaire
NF-kB	Fator nuclear kappa B
NYHA	New York Heart Association
O <sub>2</sub>	Oxigênio
OMS	Organização Mundial da Saúde
O/P	Observada/predita
PAP	Pressão da artéria pulmonar
PCR	Proteína C reativa
rHuEpo	Eritropoetina recombinante humana

SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
sTfR	Receptor solúvel da transferrina
TC6m	Teste da caminhada de 6 minutos
TNF	Fator de necrose tumoral
TSAT	Saturação da transferrina

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	8
<b>Introdução</b> .....	10
<b>Revisão da literatura</b> .....	12
Anemia na insuficiência cardíaca – aspectos gerais .....	12
Prevalência.....	13
Fisiopatologia.....	14
<i>Hemodiluição</i> .....	16
<i>Ferropenia</i> .....	16
<i>Doença renal crônica (DRC)</i> .....	17
<i>Anemia de doença crônica ou anemia da inflamação</i> .....	18
<i>Produção de eritropoetina atenuada</i> .....	19
<i>Uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA)</i> .....	21
<i>Outros</i> .....	21
Diagnóstico .....	22
Repercussão clínica / Prognóstico .....	23
Tratamento .....	25
<b>Objetivos</b> .....	28
<b>Artigo original em inglês</b> .....	41
<b>Considerações gerais</b> .....	72
<b>Anexos</b> .....	75

## RESUMO

**Introdução:** Embora a anemia esteja associada a um pior prognóstico em pacientes com insuficiência cardíaca (IC), sua fisiopatologia ainda não está completamente esclarecida especialmente em pacientes estáveis em acompanhamento ambulatorial. A interação complexa entre as alterações do metabolismo do ferro, ação das citocinas inflamatórias, doença renal crônica e atividade da medula óssea em pacientes com IC permanece com controvérsias, sendo necessários mais estudos para seu esclarecimento.

**Objetivos:** Explorar o metabolismo do ferro, hepcidina, fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$  e eritropoetina (EPO) em pacientes com IC e acompanhamento ambulatorial com e sem anemia. Investigar se a capacidade funcional desses pacientes apresenta alguma associação com a presença de anemia ou alterações no metabolismo do ferro.

**Métodos:** Foram avaliados pacientes com IC sistólica, estáveis, em acompanhamento ambulatorial, com e sem anemia (de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde), que realizaram avaliação clínica e laboratorial com a realização de exames para caracterização do metabolismo do ferro, incluindo receptor solúvel da transferrina (sTfR), também eritropoetina (EPO), taxa EPO observada/predita (O/P), TNF- $\alpha$  e hepcidina. Um subgrupo de pacientes realizou ergoespirometria para avaliação da capacidade funcional.

**Resultados:** Foram incluídos 60 pacientes (38 com anemia, idade média 65 anos, fração de ejeção média 30% e 75% do sexo masculino). A maioria dos pacientes (69%) apresentou critérios compatíveis com deficiência de ferro, independente da presença de anemia. Os pacientes com IC e anemia apresentaram níveis de hepcidina



e TNF- $\alpha$  maiores e taxa EPO O/P menores quando em comparação com o grupo de pacientes sem anemia. A saturação de transferrina (TSAT), o sTfR e a taxa EPO O/P apresentaram associação independente com a presença de anemia. No subgrupo de pacientes que foi submetido à avaliação ergoespirométrica houve uma tendência a um pico de VO<sub>2</sub> menor nos pacientes com deficiência de ferro. Também foi observada uma correlação entre o pico de VO<sub>2</sub> e a TSAT ( $r = 0,53$ ;  $p = 0,01$ ).

**Conclusões:** Em pacientes com IC e anemia, estáveis e em acompanhamento ambulatorial a presença de deficiência de ferro e a produção atenuada de EPO são comuns. Uma melhor caracterização da anemia na IC pode apresentar impacto no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para proporcionar uma melhora funcional nesses pacientes.

**Palavras chave:** insuficiência cardíaca; anemia; deficiência de ferro; hepcidina; TNF- $\alpha$ ; eritropoetina; capacidade funcional.

## INTRODUÇÃO

A insuficiência cardíaca (IC) é uma doença comum e apesar dos avanços significativos com relação ao seu tratamento, seu prognóstico continua comparável com diversos tipos de neoplasia. [1] É estimada uma taxa de mortalidade em 1 ano para pacientes em classe funcional da New York Heart Association (NYHA) II, III e IV de 10, 20 e 40% respectivamente. [2] A incidência da IC está aumentando, sendo que nos Estados Unidos estima-se que 500.000 novos casos ocorram por ano. [3] No Brasil, no ano de 2007 a IC foi responsável por 2,6% das hospitalizações e por 6% dos óbitos registrados pelo Sistema Único de Saúde, consumindo 3% do total de recursos utilizados para atender todas as internações realizadas pelo sistema. [4] Avanços nas estratégias de tratamento como a realização de bloqueio neurohormonal e a aplicação de dispositivos cardíacos, produziram uma redução importante da mortalidade nos pacientes com IC nos últimos 20 anos. [5] O desafio que se impõe nos dias de hoje é o de melhorar o bem estar dos pacientes, reduzir o número de hospitalizações e reduzir ainda mais a mortalidade. [3]

A presença de anemia é comum nos pacientes com IC. Sua prevalência aumenta com a gravidade da doença e em associação com a presença de doença renal crônica, produção de citocinas pró-inflamatórias, perdas sanguíneas, deficiência de ferro, desnutrição e/ou sobrecarga de volume. [6] Também já está bem estabelecido que a presença de anemia em pacientes com IC reduz a tolerância aos exercícios, aumenta a taxa de hospitalizações e a mortalidade geral desses pacientes independentemente da presença de outros fatores associados. [5]

Vários estudos têm procurado elucidar os mecanismos fisiopatológicos da anemia na IC, no entanto muitas dúvidas permanecem nesse sentido. Se a

repercussão clínica da anemia na IC parece de fato acarretar pior prognóstico, ainda não está esclarecido se o tratamento da anemia em si nos pacientes com IC, aumenta a sobrevida, embora alguns dados apontem uma melhora da capacidade funcional. Desta forma, é possível que um completo entendimento dos mecanismos patogênicos da anemia na IC possa trazer perspectivas mais concretas e embasadas para um manejo adequado da anemia na IC, trazendo talvez assim um novo alvo terapêutico no âmbito da IC. Neste estudo procuramos contribuir para uma maior compreensão destes mecanismos, com enfoque especial no metabolismo do ferro, na resistência à ação da EPO e no papel de mediadores inflamatórios.

## REVISÃO DA LITERATURA

### **Anemia na insuficiência cardíaca – aspectos gerais**

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define anemia com uma concentração de hemoglobina (Hb) < 13 g/dL em homens e Hb < 12 g/dL em mulheres, no entanto nem todos os estudos usam os mesmos critérios. [7] Em pessoas saudáveis a diminuição dos níveis de Hb leva a uma redução na distribuição de oxigênio (O<sub>2</sub>) para os tecidos, entretanto em indivíduos normais a quantidade total de O<sub>2</sub> distribuída em condições ideais excede em 2 – 4 vezes as necessidades basais quando em repouso. [8]

Em pacientes com IC, a presença de anemia está associada à piora dos sintomas, redução da capacidade de exercício, risco aumentado para admissões hospitalares além de uma maior mortalidade. [9]

Mecanismos cardiovasculares compensatórios para um quadro de anemia incluem um aumento no fluxo sanguíneo em repouso, o que resulta numa redução da reserva coronariana e redistribuição do fluxo sanguíneo da região subendocárdica para a região subepicárdica do miocárdio. A presença de anemia também agrava a hipóxia periférica, aumenta o retorno venoso e o trabalho cardíaco e leva conseqüentemente a hipertrofia do ventrículo esquerdo. [2, 6] Numa análise retrospectiva do estudo RENAISSANCE (*Randomized Etanercept North American Strategy to Study Antagonism of Cytokines*) foi evidenciado que um aumento de 1g/dL na Hb estava associado com uma redução de 4,1g/m<sup>2</sup> na massa ventricular esquerda, medida através de ressonância nuclear magnética, num período de observação de 24 semanas. [10] Outras alterações hemodinâmicas que ocorrem na

anemia severa incluem: aumento na pré-carga, redução da resistência vascular periférica e aumento no débito cardíaco. [11]

Redução severa da Hb (4 – 5 g/dL) está associada com retenção de sódio e água, redução do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular e evidência de ativação neurohormonal na ausência de doença cardíaca orgânica. [11] Graus menores de anemia podem contribuir para ativação neurohormonal e progressão da doença em pacientes com IC. [12]

Estudo realizado por Desai e colaboradores mostrou que a anemia, em pacientes com doença arterial coronariana sem disfunção sistólica, está associada com um aumento nos níveis de peptídeo natriurético cerebral (BNP). Isso pode indicar uma associação da anemia com um aumento na pressão ventricular e tensão do miocárdio antes mesmo da presença de disfunção ventricular clínica. [13]

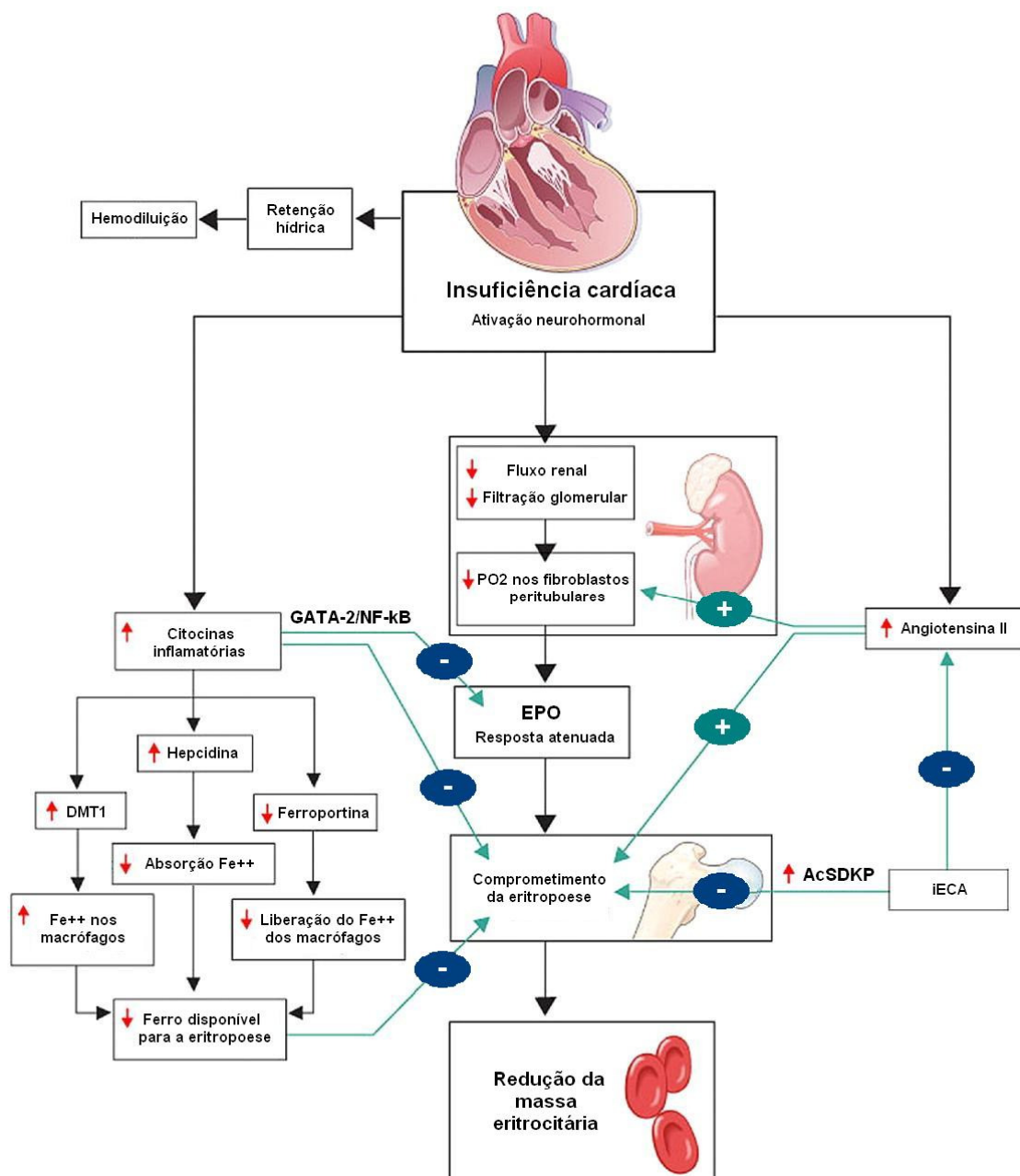
### **Prevalência**

A prevalência estimada de anemia em pacientes com IC sistólica varia de 4 – 61% (mediana 18%). Esta variação é parcialmente atribuída ao uso de diferentes definições para a anemia e das diferenças nas populações estudadas. [12] Nos pacientes ambulatoriais a prevalência de anemia é de 4 – 23%, sendo que em pacientes hospitalizados os índices podem chegar a 70%. [14, 15] A prevalência da anemia aumenta de acordo com o grau de severidade da IC. [16] Nos pacientes que realizam acompanhamento no ambulatório de Insuficiência Cardíaca e Transplante do Hospital de Clínicas de Porto Alegre a prevalência global de anemia é de 21%, sendo de 14% em pacientes do sexo masculino e 33% no sexo feminino (*dados não publicados*).

Estudos epidemiológicos mostraram que níveis mais baixos de Hb nos pacientes com IC estão associados com as seguintes características: gênero feminino, idade mais avançada, raça negra, doença renal crônica, diabetes, menor peso, uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA), pressão venosa jugular aumentada, presença de edema nos membros inferiores, pressão diastólica reduzida, grau de inflamação maior e doença avançada (baseada na fração de ejeção, capacidade funcional ao exercício, mortalidade e classe funcional da NYHA). [1, 9, 12, 17, 18]

### **Fisiopatologia (tipos de anemia / mecanismos)**

Embora a relação causal entre IC e anemia ainda não esteja bem definida, existem múltiplos potenciais mecanismos pelos quais a IC pode contribuir para o desenvolvimento da anemia. Eles são: ferropenia e outras deficiências hematínicas, sangramento, desnutrição, hemodiluição, doença renal crônica, uso de iECA e aumento de citocinas pró-inflamatórias levando à depressão da produção medular com resistência à ação da eritropoetina (EPO). [2, 3, 9]. É provável que vários desses mecanismos atuem simultaneamente e que a anemia nos pacientes com IC seja o resultado de uma interação complexa entre a performance cardíaca, ativação neurohormonal e inflamatória, função renal e resposta da medula óssea. [19] A figura abaixo ilustra os principais mecanismos que podem estar envolvidos na fisiopatologia da anemia na IC.



**Figura – Possíveis mecanismos envolvidos na fisiopatologia da anemia na insuficiência cardíaca.**

*Adaptado de* Anand, I.S., *Anemia and chronic heart failure implications and treatment options*. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(7): p. 503 [20]

**Abreviaturas:** iECA, inibidores da enzima conversora da angiotensina; AcSDKP, N-acetil-seril-aspartil-lisina; DMT1, transportador de metal divalente 1; EPO, eritropoetina; NF-kB, fator nuclear kappa B.

### *Hemodiluição*

Nos pacientes com IC uma redução na concentração de Hb pode acontecer em consequência da hemodiluição que ocorre pela ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e vasopressina levando à retenção de sódio e água. [1]

Estudo realizado por Androne e colaboradores em 37 pacientes ambulatoriais com IC avançada e anemia e sem evidência de edema periférico ao exame físico, demonstrou que 46% dos pacientes apresentaram volume eritrocitário dentro dos valores normais, ou seja, um quadro compatível com anemia por hemodiluição. [21]

Adlbrecht e colaboradores estudaram 100 pacientes ambulatoriais com IC, sendo 26 deles com anemia segundo critérios da OMS. Comparando os dois grupos de pacientes (anêmicos e não anêmicos) não houve diferença com relação à massa eritrocitária, no entanto os anêmicos apresentaram um volume plasmático significativamente maior, o qual foi o maior preditor para uma Hb reduzida em modelo de regressão múltipla realizado no estudo sendo que a presença de uma pior função renal foi o principal fator associado com a presença de hemodiluição. [22]

Outro estudo que realizou avaliação de 15 pacientes com IC e anemia, sem sinais clínicos de congestão, demonstrou uma correlação dos níveis de Hb com um aumento do volume extracelular. [23]

### *Ferropenia*

A deficiência de ferro pode ocorrer secundária a uma série de condições nos pacientes com IC, entre elas a presença de uma nutrição inadequada especialmente nos estágios mais avançados da doença; má absorção secundária ao edema de alças intestinais; uso crônico de antiagregantes plaquetários/anticoagulantes, gastrite



urêmica levando a sangramento pelo trato gastrointestinal e proteinúria nos pacientes com doença renal. [1, 24, 25] A prevalência de anemia ferropriva nos estudos realizados em pacientes com IC varia de menos de 1 a 44% [26] No entanto, Nanas e colaboradores encontraram depleção dos estoques de ferro na medula óssea em 73% dos pacientes com anemia e IC avançada estudados, apesar de níveis séricos de ferro, ferritina e EPO normais. [27] A presença de deficiência de ferro absoluta ou funcional pode ser maior do que se pensava previamente, pois os exames usados rotineiramente, como demonstrado no estudo de Nanas, não avaliam adequadamente as reservas de ferro. [20, 27]

#### *Doença renal crônica (DRC)*

A DRC é uma comorbidade comum nos pacientes com IC. Em uma metanálise de 16 estudos, Smith e colaboradores encontraram que 63% de 80.098 pacientes com IC apresentavam algum grau de DRC, sendo 29% com critérios para DRC severa. [28] A DRC é um preditor independente para um aumento no risco de anemia, como demonstrado em diversos estudos. Também já foi observado que pacientes com IC grave apresentam uma prevalência maior de DRC. [12, 29]

A causa da anemia em pacientes com DRC é multifatorial. A mais conhecida é a produção de EPO inadequada, a qual está geralmente combinada com deficiência de ferro. O mecanismo pelo qual a produção de EPO está comprometida nos pacientes com DRC ainda não está bem estabelecido. Também a sobrevivência das hemácias encontra-se diminuída nesses pacientes, com duração de aproximadamente 60 – 90 dias. [30]

Apesar da alta prevalência de disfunção renal em pacientes com IC, os níveis circulantes de EPO estão geralmente normais a elevados com uma correlação entre o aumento nos valores de EPO com uma piora na classe funcional. [19]

*Anemia de doença crônica ou anemia da inflamação (AI)*

A IC leva a um estado de ativação inflamatória persistente, onde são encontrados níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias e esses valores estão associados com maior severidade da doença e piores desfechos. [19] Em pacientes com IC o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias ou outros marcadores inflamatórios (proteína C reativa) estão inversamente correlacionados com o nível de Hb. [12]

As citocinas pró-inflamatórias fator de necrose tumoral alfa (TNF)- $\alpha$ , interleucina (IL)-1 e IL-6 reduzem a secreção renal de EPO, suprimem a atividade da EPO sobre os precursores eritróides na medula óssea e reduzem a biodisponibilidade dos estoques de ferro para a síntese de Hb. As citocinas também aumentam os níveis do peptídeo hormonal hepcidina. A hepcidina interage com a ferroportina e outras proteínas transportadoras de ferro no enterócito para inibir a absorção de ferro. [6, 12] A hepcidina também impede a liberação de ferro das reservas do sistema retículo endotelial levando a um quadro de deficiência funcional de ferro. [31]

Estudos em humanos não tem demonstrado uma correlação tão clara entre a dosagem de hepcidina com a presença de AI em pacientes com IC. Adlbrecht e colaboradores compararam pacientes com IC anêmicos e não anêmicos e não encontraram diferença na dosagem de pró-hepcidina entre os grupos. Também não houve correlação entre os níveis de pró-hepcidina com presença de deficiência de ferro. [22] Já Matsumoto e colaboradores avaliaram os níveis de hepcidina em 61

pacientes com IC hospitalizados. Os pacientes com anemia (n = 36) apresentaram níveis de hepcidina inferiores aos dos pacientes sem anemia e aos do grupo de controles sadios ( $p < 0,05$ ), o que pode indicar que nesses pacientes o metabolismo do ferro e não a presença de inflamação, como previamente descrito, controla a produção de hepcidina. Esse estudo também não evidenciou correlação dos níveis de IL-6 com os de hepcidina. [32]

Ainda com relação às citocinas inflamatórias, estudos em animais mostraram uma evidência direta da supressão da produção de EPO pela ação das mesmas. [33] As citocinas inflamatórias também reduzem a sensibilidade dos precursores eritróides sobre a ação da EPO, bloqueando os efeitos antiapoptóticos e a aceleração da maturação.

Estudo realizado por Opasich e colaboradores em 148 pacientes com IC sistólica ou diastólica e anemia encontrou uma prevalência de 57% de anemia de doença crônica, sendo que desses pacientes 63% apresentaram níveis altos de receptor solúvel da transferrina (sTfR) e/ou saturação da transferrina indicando a presença de eritropoese deficiente em ferro associada. [34]

#### *Produção de eritropoetina atenuada*

A EPO é essencial para a manutenção das concentrações plasmáticas de Hb. É um fator de crescimento hormonal glicoproteico produzido pelo rim como parte do sistema homeostático para regulação da massa eritrocitária e liberação de oxigênio para os tecidos. Ela é produzida pelos fibroblastos peritubulares do córtex renal em resposta à presença de hipóxia local. [1, 9] No sistema hematopoético, a EPO age inibindo a apoptose das células progenitoras eritróides e estimulando a sua proliferação, maturação e diferenciação. [12]

A ação da EPO é mediada por receptores específicos que estão presentes nas células precursoras eritróides localizadas na medula óssea através da ativação da via de transdução JAK2/STAT5. Também existem receptores para EPO em outros órgãos como o coração, endotélio vascular, retina e cérebro. [35]

A elevação inadequada de EPO pode ser uma consequência da produção aumentada de citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6). Ambos TNF- $\alpha$  e IL-1 inibem a produção de EPO *in vitro*. [1] O TNF- $\alpha$  e a IL-6 inibem a produção de EPO pelo rim através da ativação da proteína ligadora GATA2 e do fator nuclear kB e também inibindo a proliferação das células progenitoras eritróides. [20]

Nos pacientes com IC os níveis de EPO se elevam com a piora da classe funcional. No entanto, o aumento da EPO nesses pacientes é menor que o esperado para o grau de anemia o que caracteriza a produção atenuada de eritropoetina. [1, 12]

Outro aspecto a ser considerado é a possível presença de resistência à ação da EPO nos órgãos alvo. Opasich e colaboradores estudaram 148 pacientes com IC sistólica ou diastólica e encontraram uma prevalência de 57% de AI, sendo que desses pacientes 76% apresentaram evidência de produção de EPO endógena deficiente, a qual foi caracterizada por uma taxa do EPO observada/predita abaixo de 0,8. [34] van der Meer e colaboradores avaliaram 74 pacientes com anemia e IC em classe funcional NYHA III ou IV e observaram que 39% apresentaram produção de EPO atenuada, embora esse estudo tenha associado uma produção de EPO maior que a esperada como um preditor para maior mortalidade. [36] São necessários mais estudos em humanos com IC para esclarecer o quanto a deficiência ou resistência a EPO são relevantes na fisiopatologia da anemia na IC. [1]

### *Uso de inibidores da enzima conversora da angiotensina (iECA)*

A angiotensina II aumenta a secreção de EPO através da redução do fluxo renal e do aumento da reabsorção peritubular. Ela também pode ter efeitos estimulatórios diretos nos precursores eritróides. A inibição do SRAA através do uso de iECA ou bloqueadores do receptor da angiotensina II está associada com uma diminuição da produção de EPO e conseqüentemente redução dos níveis de Hb, como demonstrado em alguns estudos realizados em pacientes com IC. [1, 12, 37] O bloqueio da angiotensina estimula a liberação da N-acetil-seril-aspartil-lisina (AcSDKP) um inibidor da proliferação dos eritrócitos. [38]

No estudo SOLVD (*Studies of Left Ventricular Dysfunction*) o uso de enalapril aumentou a razão de chance para incidência de anemia em 56%. [37] Estudo realizado por Terrovitis e colaboradores comparando dose padrão com dose alta de enalapril em pacientes com IC sistólica mostrou uma queda do Ht de  $43,2 \pm 4,9\%$  para  $40,7 \pm 4,4\%$  em dois anos de seguimento no grupo que usou doses mais altas de enalapril (média:  $42 \pm 19,3$  mg/dia). [24]

### *Outros*

Estudo realizado em 92 pacientes do sexo masculino mostrou uma correlação negativa entre a taxa de cortisol/dehidroepiandrosterona com relação à Hb sugerindo que alterações no metabolismo dos esteróides podem estar associadas com o desenvolvimento de anemia nos pacientes com IC. [39]

Outro mecanismo que vem sendo estudado como causador de anemia nos pacientes com IC é a presença de disfunção na medula óssea. Iversen e colaboradores estudaram as células progenitoras da medula óssea de camundongos em modelo de IC induzido por isquemia miocárdica e encontraram uma redução na capacidade de

proliferação das células progenitoras, aumento na apoptose e níveis aumentados de TNF- $\alpha$  quando em comparação com controles sem IC. [40] Westerbrink e colaboradores avaliaram a medula óssea de 20 pacientes com IC (com e sem anemia) que foram submetidos a cirurgia de revascularização miocárdica. Foi observada uma redução na quantidade de precursores eritróides e mielóides e maior apoptose quando em comparação com controles sem IC, apesar de níveis de EPO e quantidade de receptores de EPO semelhantes. A IC parece levar a uma disfunção da medula óssea que afeta múltiplas linhagens hematopoéticas. [41]

### **Diagnóstico**

A avaliação da anemia nos pacientes com IC deve iniciar com a repetição do hemograma para confirmação do resultado da Hb, já que muitos pacientes apresentam variações transitórias nos níveis de Hb especialmente durante quadros de descompensação, alteração na dose de diuréticos e internação hospitalar. [14]

A anemia associada à IC é caracterizada por ser uma anemia hipoproliferativa, com contagem de reticulócitos diminuída ou dentro dos valores normais. Na avaliação inicial devem ser realizados exames para avaliar deficiência de ferro: ferritina, ferro, capacidade ferropéxica e transferrina. Também é necessário descartar outras deficiências hematínicas através da dosagem de vitamina B12 e ácido fólico e avaliar a função renal e tireoidiana. [42]

Existem algumas limitações dos testes diagnósticos para anemia nos pacientes com IC. A ferritina é uma proteína de fase aguda e pode estar aumentada na presença de quadros inflamatórios. A transferrina também pode estar aumentada nessas situações ou reduzida em quadros de desnutrição e na presença de doenças crônicas. Existem flutuações diurnas significativas (17 – 70%) nas dosagens da saturação da

transferrina, o que torna a utilidade deste teste para diagnóstico diferencial de anemia mais limitada. [43] Novos exames para diagnóstico de deficiência funcional de ferro como conteúdo de Hb dos reticulócitos, porcentagem de hemácias hipocrômicas, sTfR e a taxa sTfR/log ferritina vem sendo avaliados em estudos investigacionais, no entanto sua aplicabilidade clínica para avaliação de pacientes com IC e anemia ainda não está estabelecida. [44]

Na ausência de uma causa definida para anemia, com a realização de exames laboratoriais, pode ser realizada a quantificação da massa eritrocitária para avaliação de quadro de hemodiluição, já que os sinais e sintomas de congestão não são bons preditores para avaliação de sobrecarga de volume na IC. [23, 27]

Finalmente, o exame da medula óssea deve ser reservado para pacientes com anemia severa sem causa definida, na presença de outras citopenias associadas ou suspeita de patologia hematológica. [45, 46]

### **Repercussão clínica / Prognóstico**

A presença de anemia é um fator preditor independente para um pior desfecho clínico nos pacientes com IC como evidenciado em diversos estudos. [3, 10, 30, 31] Al-Ahmad e colaboradores encontraram um aumento de 2,7% no risco ajustado para mortalidade a cada redução de 1% no Ht. [47] Kosiborod e colaboradores encontraram um aumento de 2% no risco de morte em um ano a cada redução de 1% no Ht em pacientes idosos hospitalizados por IC. [25] Mozaffarian e colaboradores encontraram um aumento de 3% de mortalidade para queda de 1% no Ht. [29] van der Meer e colaboradores encontraram uma *Hazard ratio* (HR) de 3,28 (IC 95% 1,31 – 8,18; p = 0,01). [35] Ishani e colaboradores encontraram que para cada redução de 1 g/dL na Hb houve um aumento de 2,7% na mortalidade num

período de 33 meses. [25], sendo que o prognóstico é pior quanto mais baixo o nível de Hb, no entanto mesmo a presença de graus leves de anemia já está associada a uma pior sobrevida. [2] Estudo de coorte de 12.065 pacientes com IC no Canadá mostrou que os pacientes com anemia apresentam um HR para mortalidade de 1,34 (1,24 – 1,46). [24] Alguns estudos como o de Dunlay e colaboradores demonstraram que a relação entre mortalidade e os níveis de Hb seguem uma curva em J, com um aumento na mortalidade com níveis de Hb < 14 mg/dL e níveis > 16 mg/dL. [48]

Outros estudos também têm demonstrado que pacientes com IC que apresentam constantemente anemia ou desenvolvem anemia durante seu acompanhamento apresentam uma mortalidade mais elevada, quando em comparação com pacientes com IC que não tem anemia ou que apresentam recuperação nos níveis de Hb durante o seu seguimento. Esse fato pode indicar que o acompanhamento nos níveis de Hb pode ter mais significado prognóstico que apenas uma medida isolada. [14, 49]

Ainda não existem estudos que avaliaram se algum tipo específico de anemia apresenta um risco maior de morbimortalidade nos pacientes com IC, no entanto, Androne e colaboradores encontraram que pacientes com anemia dilucional apresentam pior prognóstico que pacientes com anemia “verdadeira”. [1, 16]. Este aspecto específico pode indicar que na anemia de caráter dilucional o pior prognóstico pode estar associado a um estado congestivo, o que sabidamente na IC acarreta pior desfecho. [50]

De forma geral, os potenciais mecanismos ligando a presença de anemia com um risco aumentado de mortalidade nos pacientes com IC ainda não foram bem caracterizados, mas podem estar relacionados a mudanças nas condições de enchimento ventricular e estrutura cardíaca, ativação neurohormonal ou redução da



capacidade de “limpeza” dos radicais livres. É também possível que a presença de anemia seja um marcador de doença miocárdica mais severa. [12]

Há um entendimento de que a anemia possa exacerbar a IC através de um ciclo vicioso no qual a hipóxia tecidual e a liberação de óxido nítrico causam vasodilatação periférica levando à redução da pressão arterial, o que por sua vez causa aumento na ativação simpática, vasoconstrição renal, redução na função renal e ativação do SRAA e vasopressina. Essa cascata de acontecimentos leva à retenção hídrica, hipertrofia ventricular esquerda e dilatação, liberação de BNP e piora da IC, para completar o ciclo vicioso piora da anemia. Esse quadro é chamado de síndrome cardiorenal. [38]

A presença de anemia nos pacientes com IC também está associada com uma pior capacidade física, pior função hemodinâmica, menor taxa de filtração glomerular, níveis de albumina menores, índice de massa corporal menor e sintomas clínicos mais severos. [31, 32]

### **Tratamento**

O tratamento da anemia abriu uma nova fronteira no manejo dos pacientes com IC. Dados preliminares mostram que o tratamento adequado da anemia pode ocasionar melhora na função ventricular, classe funcional, tolerância ao esforço e qualidade de vida. [3] O tratamento inicial sempre deve ser a otimização do tratamento para IC. A transfusão de concentrado de hemácias pode ser considerada como tratamento agudo para anemia severa em casos individualizados, mas não é uma boa estratégia de tratamento no longo prazo. [12]

Mais recentemente duas terapêuticas específicas têm sido consideradas: o uso de agentes estimuladores da eritropoese (AEE) e o uso de suplementação de ferro [9]

O conhecimento atual da EPO recombinante humana (rHuEpo) como um agente terapêutico para o tratamento da anemia vem principalmente através de estudos realizados em pacientes com DRC. [9, 12] Estudos preliminares em pacientes com IC demonstraram que o uso de rHuEpo é bem tolerado e associado com benefícios clínicos a curto prazo. [35] No entanto, o tratamento com AEE aumenta a pressão arterial e está associado com um risco aumentado de trombose, o que pode aumentar o risco cardiovascular. [7, 10] Este risco pode ser parcialmente atribuído aos efeitos dos níveis aumentados de Hb na viscosidade sanguínea, interações entre as plaquetas e os eritrócitos ou efeitos diretos da EPO nas plaquetas e/ou células endoteliais. [12] No entanto, especula-se que o uso de AEE pode trazer outros benefícios para os pacientes com IC além do aumento da Hb como redução da apoptose dos miócitos, da fibrose cardíaca e da secreção de mediadores inflamatórios, efeito anti-oxidante positivo e neovascularização. [51]

Com relação ao uso de ferro parenteral, este pode ser importante nos pacientes com anemia e IC, pois a presença de deficiência funcional de ferro caracterizada pela redução da disponibilidade de ferro para eritropoese parece ser um problema comum na IC. [12] Estudos recentes como o FERRIC-HF e o FAIR-HF demonstraram uma melhora na classe funcional e escores de qualidade de vida após tratamento com ferro parenteral em pacientes com deficiência funcional de ferro, inclusive em pacientes sem anemia. [52, 53] Também está em andamento o estudo IRON-HF que irá comparar o uso de ferro parenteral ou oral contra placebo em pacientes com anemia e IC. [54] Existem algumas preocupações com relação ao uso de ferro parenteral, como a ocorrência de reações alérgicas, embora muito raras com as principais preparações usadas e também com o fato que o ferro pode acelerar a

formação de radicais livres, aumentar o estresse oxidativo e causar disfunção endotelial. [55, 56]

Até o presente momento não existe um consenso com relação ao tratamento da anemia associada à IC, bem como quais os níveis de Hb que devem ser alcançados. [9, 16] Recentemente vêm sendo levantados questionamentos com relação aos níveis alvo de Hb e o risco aumentado de mortalidade em pacientes com DRC que fazem uso de AEE. [38] Com relação aos pacientes com IC e anemia, até o momento não existem estudos que tenham associado o uso de AEE com maior risco de morbimortalidade, no entanto ensaios clínicos com maior tempo de seguimento são necessários para confirmar esses resultados. [9, 12]

Na tabela abaixo encontram-se os resultados dos principais estudos clínicos para o tratamento de anemia na IC em pacientes com disfunção sistólica.

<b>Autor, Ano</b>	<b>n</b>	<b>Desenho do estudo</b>	<b>Crítérios de inclusão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Desfechos</b>
Silverberg e cols., 2000 [17]	26	Aberto, não controlado	Hb < 12g/dL, NYHA > III	α-EPO + Ferro-sacarose IV	↓ da dose de diurético, na classe funcional NYHA e n° de hospitalizações. ↑ FE.
Silverberg e cols., 2001 [57]	32	Aberto, randomizado, controlado	Hb 10-11,5g/dL, NYHA III/IV	α-EPO + Ferro-sacarose IV	↓ da dose de diurético, na classe funcional NYHA e n° de hospitalizações. ↑ FE.
Mancini e cols., 2003 [58]	26	ECR, com grupo placebo	NYHA III/IV, Ht < 35% e Cr < 2,5 mg/dL	α-EPO + ferro VO + folato VO	↑ no pico de VO <sub>2</sub> e duração do esforço.
Palazzuoli e cols., 2006 [59]	40	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA III/IV, Hb < 11 g/dL, DRC	β-EPO + ferro VO	↑ tempo de teste de esforço, TC6m, pico de VO <sub>2</sub> . ↓ BNP, Cr e classe funcional NYHA.
Bolger e cols., 2006 [60]	16	Aberto, não controlado	Hb ≤ 12g/dL, NHYA II/III	Ferro-sacarose IV	↑ no escore MLHFQ e no TC6m e ↓ classe funcional NYHA.
Palazzuoli e cols., 2007 [61]	51	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA III/IV, Hb < 11,5 g/dL, Cr 1,5 – 3 mg/dL	β-EPO + ferro VO	↑ na FE. ↓ no volume e massa dos ventrículos, PAP e BNP.
Zilberman e cols., 2007 [62]	38	Aberto, não controlado	NYHA II/III, Hb < 12 g/dL	α-EPO + ferro-sacarose IV	Melhora nos parâmetros de apnéia do sono e na classe funcional NYHA.
van Veldhuisen e cols., 2007 [63]	165	ECR, duplo cego, com grupo placebo	Hb: 9,0 – 12,5g/dL, TSAT ≥ 15%	Darbepoetina-α	Melhora no escore do questionário KCCQ.
Tobbi e cols., 2007 [64]	40	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA II/IV, Hb < 12,5g/dl, deficiência de ferro, DCE ≤ 90 mL/min	Ferro-sacarose IV	↑ na DCE, FE, escore MLHFQ e TC6m. ↓ BNP, PCR e n° de hospitalizações.

<b>Autor, Ano</b>	<b>n</b>	<b>Desenho do estudo</b>	<b>Crítérios de inclusão</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Desfechos</b>
FERRIC-HF Okonko e cols., 2008 [52]	35	ECR, aberto	NYHA II/III, deficiência de ferro	Ferro-sacarose IV	Melhora na classe funcional e escore MLHFQ.
STAMINA-HeFT Ghali e cols., 2008 [65]	319	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA II/IV, Hb 9 – 12,5 g/dL, TSAT $\geq$ 15%	Darbepoetina- $\alpha$	Tendência não significativa para redução de mortalidade ou 1ª hospitalização por IC (P = 0,1).
Kourea e cols., 2008 [66]	41	ECR, controlado por placebo	NYHA II/III, Hb < 12,5 g/dL, Cr < 2,5 mg/dL	Darbepoetina- $\alpha$ + ferro VO	↓ BNP, ligante solúvel Fas e IL-6. ↑ na FE e TC6m.
Parissis e cols., 2008 [67]	32	ECR, controlado por placebo	NYHA II/III, Hb < 12,5 g/dL, Cr < 2,5 mg/dL	Darbepoetina- $\alpha$ + ferro VO	↑ na FE e outros índices ecocardiográficos. ↑ TC6m. ↓ na classe funcional NYHA e BNP.
Comín-Colet e cols., 2009 [68]	65	Aberto, controlado, sem placebo	NYHA III/IV, anemia, Cr < 3 mg/dL	$\beta$ -EPO + ferro-sacarose IV	↓ classe funcional NYHA, BNP, nº de reinternações e mortalidade geral ou internações por causas CV.
FAIR-HF Anker e cols., 2009 [69]	459	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA II/III, Hb: 9,5 – 13,5 g/dL e deficiência de ferro	Carboximaltose férrica IV	Melhora na classe funcional NYHA e no “ <i>Patient Global Assessment</i> ”.
Ngo e cols., 2010 [70]	794	Metanálise (11 ECR)	-	Agentes estimuladores da eritropoese	↑ na duração do exercício, TC6m, pVO2, FE e Hb. ↓ na classe funcional NYHA, BNP, taxa de hospitalizações e mortalidade geral.
IRON-HF Beck-da-Silva e cols., 2007 [54]	120	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA II-IV, Hb 9 – 12 g/dL, deficiência de ferro e Cr $\leq$ 1,5 mg/dL	Ferro-sacarose IV ou Ferro VO	Em fase de recrutamento. NCT00386126
RED-HF McMurray e cols., 2009 [71]	2600	ECR, duplo cego, com grupo placebo	NYHA II-IV, Hb 9 – 12g/dL, e Cr $\leq$ 3 mg/dL	Darbepoetina- $\alpha$	Em fase de recrutamento. NCT00358215

**Abreviaturas:** NYHA, New York Heart Association; FE, fração de ejeção; MLHFQ, *Minnesota Living with Heart Failure Questionnaire*; TC6m, Teste da caminhada de 6 minutos, ECR = ensaio clínico randomizado, PAP, pressão da artéria pulmonar; BNP, peptídeo natriurético cerebral; TSAT, saturação da transferrina; PCR, proteína C reativa; KCCQ, *Kansas City Cardiomyopathy Questionnaire*

Apesar dos avanços que vem ocorrendo nos últimos anos com relação a um melhor entendimento sobre a fisiopatologia da anemia na IC e ao seu tratamento, várias dúvidas ainda permanecem sobre este assunto. Cada vez mais são necessários novos estudos que possam aprofundar esses conhecimentos propiciando talvez uma nova oportunidade no manejo dos pacientes com IC, que é uma doença causadora de grande morbimortalidade, que vem aumentando sua incidência em todo o mundo e é responsável por uma grande parcela de gastos do nosso sistema de saúde.

## **OBJETIVOS**

Caracterizar a anemia presente em pacientes com IC, em acompanhamento ambulatorial e quadro clínico estável com relação ao metabolismo do ferro, produção de eritropoetina e à presença de mediadores inflamatórios.

Em um subgrupo de pacientes, explorar a associação entre capacidade funcional avaliada por ergoespirometria e a presença ou não de anemia, e com aspectos do metabolismo do ferro.

**REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA**

1. Okonko, D.O. and S.D. Anker, *Anemia in chronic heart failure: pathogenetic mechanisms*. J Card Fail, 2004. 10(1 Suppl): p. S5-9.
2. Klutstein, M.W. and D. Tzivoni, *Anaemia and heart failure: aetiology and treatment*. Nephrol Dial Transplant, 2005. 20 Suppl 7: p. vii7-10.
3. Lewis, B.S., et al., *Anaemia and heart failure: statement of the problem*. Nephrol Dial Transplant, 2005. 20 Suppl 7: p. vii3-6.
4. Bocchi EA, M.-B.F., Ayub-Ferreira SM, Rohde LE, Oliveira WA, Almeida DR, e cols. Sociedade Brasileira de Cardiologia., *III Diretriz Brasileira de Insuficiência Cardíaca Crônica*. Arq Bras Cardiol, 2009. 93(1 supl.1): p. 1-71.
5. Stamos, T.D. and M.A. Silver, *Management of anemia in heart failure*. Curr Opin Cardiol, 2010. 25(2): p. 148-54.
6. Horl, W.H. and G. Ertl, *Anaemia and the heart*. Eur J Clin Invest, 2005. 35 Suppl 3: p. 20-5.
7. Dallman, *Iron Nutrition in Health and Disease*. 1996, Eastleigh, UK.: John Libbey & Co.
8. Hebert, P.C., et al., *Physiologic aspects of anemia*. Crit Care Clin, 2004. 20(2): p. 187-212.
9. Murphy, N.F. and K. McDonald, *Treatment of anaemia in chronic heart failure--optimal approach still unclear*. Eur Heart J, 2007. 28(18): p. 2185-7.
10. Anand, I., et al., *Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure*. Circulation, 2004. 110(2): p. 149-54.



11. Anand, I.S., et al., *Pathogenesis of oedema in chronic severe anaemia: studies of body water and sodium, renal function, haemodynamic variables, and plasma hormones*. Br Heart J, 1993. 70(4): p. 357-62.
12. Tang, Y.D. and S.D. Katz, *Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options*. Circulation, 2006. 113(20): p. 2454-61.
13. Desai, A.S., et al., *Association between anaemia and N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP): findings from the Heart and Soul Study*. Eur J Heart Fail, 2007. 9(9): p. 886-91.
14. Tang, W.H., et al., *Evaluation and long-term prognosis of new-onset, transient, and persistent anemia in ambulatory patients with chronic heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(5): p. 569-76.
15. Anand, I.S., *Heart failure and anemia: mechanisms and pathophysiology*. Heart Fail Rev, 2008. 13(4): p. 379-86.
16. Kazory, A. and E.A. Ross, *Anemia: the point of convergence or divergence for kidney disease and heart failure?* J Am Coll Cardiol, 2009. 53(8): p. 639-47.
17. Silverberg, D.S., 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 Cardiol, 2000. 35(7): p. 1737-44.
18. Adams, K.F., Jr., et al., *Prospective assessment of the occurrence of anemia in patients with heart failure: results from the Study of Anemia in a Heart*

- Failure Population (STAMINA-HFP) Registry*. Am Heart J, 2009. 157(5): p. 926-32.
19. Felker, G.M., et al., *Anemia as a risk factor and therapeutic target in heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2004. 44(5): p. 959-66.
  20. Anand, I.S., *Anemia and chronic heart failure implications and treatment options*. J Am Coll Cardiol, 2008. 52(7): p. 501-11.
  21. Androne, A.S., et al., *Hemodilution is common in patients with advanced heart failure*. Circulation, 2003. 107(2): p. 226-9.
  22. Adlbrecht, C., et al., *Chronic heart failure leads to an expanded plasma volume and pseudoanaemia, but does not lead to a reduction in the body's red cell volume*. Eur Heart J, 2008. 29(19): p. 2343-50.
  23. Westenbrink, B.D., et al., *Anaemia in chronic heart failure is not only related to impaired renal perfusion and blunted erythropoietin production, but to fluid retention as well*. Eur Heart J, 2007. 28(2): p. 166-71.
  24. Ezekowitz, J.A., F.A. McAlister, and P.W. Armstrong, *Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure*. Circulation, 2003. 107(2): p. 223-5.
  25. Kosiborod, M., et al., *The prognostic importance of anemia in patients with heart failure*. Am J Med, 2003. 114(2): p. 112-9.
  26. Ghali, J.K., *Anemia and heart failure*. Curr Opin Cardiol, 2009. 24(2): p. 172-8.
  27. Nanas, J.N., et al., *Etiology of anemia in patients with advanced heart failure*. J Am Coll Cardiol, 2006. 48(12): p. 2485-9.

28. Smith, G.L., et al., *Renal impairment and outcomes in heart failure: systematic review and meta-analysis*. J Am Coll Cardiol, 2006. 47(10): p. 1987-96.
29. Silverberg, D., et al., *The cardio-renal anaemia syndrome: does it exist?* Nephrol Dial Transplant, 2003. 18 Suppl 8: p. viii7-12.
30. Lankhorst, C.E. and J.B. Wish, *Anemia in renal disease: diagnosis and management*. Blood Rev, 2009. 24(1): p. 39-47.
31. Dec, G.W., *Anemia and iron deficiency--new therapeutic targets in heart failure?* N Engl J Med, 2009. 361(25): p. 2475-7.
32. Matsumoto, M., et al., *Iron regulatory hormone hepcidin decreases in chronic heart failure patients with anemia*. Circ J, 2010. 74(2): p. 301-6.
33. Forhecz, Z., et al., *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): p. 659-66.
34. Opasich, C., 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): p. 2232-7.
35. Katz, S.D., et al., *Treatment of anemia in patients with chronic heart failure*. J Card Fail, 2004. 10(1 Suppl): p. S13-6.
36. van der Meer, P., et al., *Adequacy of endogenous erythropoietin levels and mortality in anaemic heart failure patients*. Eur Heart J, 2008. 29(12): p. 1510-5.
37. Ishani, A., et al., *Angiotensin-converting enzyme inhibitor as a risk factor for the development of anemia, and the impact of incident anemia on mortality in*

- patients with left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2005. 45(3): p. 391-9.*
38. Besarab, A., W.H. Horl, and D. Silverberg, *Iron metabolism, iron deficiency, thrombocytosis, and the cardiorenal anemia syndrome. Oncologist, 2009. 14 Suppl 1: p. 22-33.*
  39. Okonko, D.O., et al., *Association of deranged adrenal steroid metabolism with anemia in chronic heart failure. Am J Cardiol, 2005. 96(1): p. 101-3.*
  40. Iversen, P.O., et al., *Decreased hematopoiesis in bone marrow of mice with congestive heart failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2002. 282(1): p. R166-72.*
  41. Westenbrink, B.D., et al., *Bone marrow dysfunction in chronic heart failure patients. Eur J Heart Fail, 2010.*
  42. Hoffman, R., *Hematology : basic principles and practice. 4th ed. 2005, Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. xxix, 2821 p.*
  43. Wish, J.B., *Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. Clin J Am Soc Nephrol, 2006. 1 Suppl 1: p. S4-8.*
  44. Park, G., et al., *Soluble transferrin receptor-ferritin index and estimated body iron in iron-deficiency anemia in "select" chronic diseases. Ann Hematol, 2009. 88(9): p. 913-5.*
  45. Bain, B.J., *Bone marrow trephine biopsy. J Clin Pathol, 2001. 54(10): p. 737-42.*
  46. Bain, B.J., *Bone marrow aspiration. J Clin Pathol, 2001. 54(9): p. 657-63.*
  47. Al-Ahmad, A., et al., *Reduced kidney function and anemia as risk factors for mortality in patients with left ventricular dysfunction. J Am Coll Cardiol, 2001. 38(4): p. 955-62.*

48. Dunlay, S.M., et al., *Anemia and heart failure: a community study*. Am J Med, 2008. 121(8): p. 726-32.
49. Peterson, P.N., et al., *Association of longitudinal measures of hemoglobin and outcomes after hospitalization for heart failure*. Am Heart J, 2010. 159(1): p. 81-9.
50. Rohde, L.E., et al., *Reliability and prognostic value of traditional signs and symptoms in outpatients with congestive heart failure*. Can J Cardiol, 2004. 20(7): p. 697-702.
51. Sandhu, A., et al., *Managing anemia in patients with chronic heart failure: what do we know?* Vasc Health Risk Manag, 2010. 6: p. 237-52.
52. Okonko, D.O., et al., *Effect of intravenous iron sucrose on exercise tolerance in anemic and nonanemic patients with symptomatic chronic heart failure and iron deficiency FERRIC-HF: a randomized, controlled, observer-blinded trial*. J Am Coll Cardiol, 2008. 51(2): p. 103-12.
53. Anker, S.D., et al., *Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency*. N Engl J Med, 2009. 361(25): p. 2436-48.
54. Beck-da-Silva, L., et al., *Rationale and design of the IRON-HF study: a randomized trial to assess the effects of iron supplementation in heart failure patients with anemia*. J Card Fail, 2007. 13(1): p. 14-7.
55. Lipsic, E. and P. van der Meer, *Erythropoietin, iron, or both in heart failure: FAIR-HF in perspective*. Eur J Heart Fail, 2010. 12(2): p. 104-5.
56. Auerbach, M., H. Ballard, and J. Glaspy, *Clinical update: intravenous iron for anaemia*. Lancet, 2007. 369(9572): p. 1502-4.
57. Silverberg, D.S., 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): p. 1775-80.
58. Mancini, D.M., et al., *Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure.* Circulation, 2003. 107(2): p. 294-9.
59. Palazzuoli, A., et al., *Erythropoietin improves anemia exercise tolerance and renal function and reduces B-type natriuretic peptide and hospitalization in patients with heart failure and anemia.* Am Heart J, 2006. 152(6): p. 1096 e9-15.
60. Bolger, A.P., et al., *Intravenous iron alone for the treatment of anemia in patients with chronic heart failure.* J Am Coll Cardiol, 2006. 48(6): p. 1225-7.
61. Palazzuoli, A., et al., *Effects of beta-erythropoietin treatment on left ventricular remodeling, systolic function, and B-type natriuretic peptide levels in patients with the cardiorenal anemia syndrome.* Am Heart J, 2007. 154(4): p. 645 e9-15.
62. Zilberman, M., et al., *Improvement of anemia with erythropoietin and intravenous iron reduces sleep-related breathing disorders and improves daytime sleepiness in anemic patients with congestive heart failure.* Am Heart J, 2007. 154(5): p. 870-6.
63. van Veldhuisen, D.J., 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 Heart J, 2007. 28(18): p. 2208-16.

64. Toblli, J.E., et al., *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): p. 1657-65.
65. Ghali, J.K., et al., *Randomized double-blind trial of darbepoetin alfa in patients with symptomatic heart failure and anemia*. Circulation, 2008. 117(4): p. 526-35.
66. Kourea, K., et al., *Effects of darbepoetin-alpha on plasma pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and soluble Fas/Fas ligand system in anemic patients with chronic heart failure*. Atherosclerosis, 2008. 199(1): p. 215-21.
67. Parissis, J.T., et al., *Effects of darbepoetin alpha on right and left ventricular systolic and diastolic function in anemic patients with chronic heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy*. Am Heart J, 2008. 155(4): p. 751 e1-7.
68. Comin-Colet, J., et al., *A pilot evaluation of the long-term effect of combined therapy with intravenous iron sucrose and erythropoietin in elderly patients with advanced chronic heart failure and cardio-renal anemia syndrome: influence on neurohormonal activation and clinical outcomes*. J Card Fail, 2009. 15(9): p. 727-35.
69. Anker, S.D., et al., *Rationale and design of Ferinject assessment in patients with IRon deficiency and chronic Heart Failure (FAIR-HF) study: a randomized, placebo-controlled study of intravenous iron supplementation in patients with and without anaemia*. Eur J Heart Fail, 2009. 11(11): p. 1084-91.

70. Ngo, K., et al., *Erythropoiesis-stimulating agents for anaemia in chronic heart failure patients*. Cochrane Database Syst Rev, 2010(1): p. CD007613.
71. McMurray, J.J., 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): p. 795-801.



**ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS**

**Functional iron deficiency and blunted erythropoietin production  
contribute to the pathogenesis of anemia in patients with heart failure**

**Short running title:** *pathogenesis of anemia in heart failure*

Divisions of Cardiology and Hematology,  
Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
Post-Graduate Program on Clinical Sciences, Faculty of Medicine  
Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

### Abstract

**Background:** Although anemia is associated to adverse outcomes in heart failure (HF), its pathogenesis remains poorly understood, particularly in stable outpatients. The complex interaction of iron metabolism, inflammation, renal impairment and bone marrow responses in HF remains controversial, deserving further exploratory studies.

**Objectives:** To explore iron metabolism, hepcidin, tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and erythropoietin (EPO) in HF outpatients with and without anemia. We also investigated whether functional capacity was associated to anemia and/or changes in iron metabolism.

**Methods:** Stable systolic HF outpatients with and without anemia (according to World Health Organization criteria) underwent clinical and laboratory evaluation, including complete iron panel and EPO levels, as well as EPO observed/predicted (O/P) ratio calculation. Soluble transferrin receptor (sTfR), hepcidin and TNF- $\alpha$  were measured by ELISA. Ergoespirometry was performed in a subgroup of patients.

**Results:** We studied 60 HF outpatients (38 anemic, 65 years-old, mean ejection fraction 30% and 75% male). The majority of patients (69%) met criteria for iron deficiency, irrespective of anemia. Anemic patients had elevated hepcidin and TNF- $\alpha$  levels, while their EPO O/P ratio was abnormally low. Transferrin saturation (TSAT), sTfR and EPO O/P ratio were independently associated to anemia. There was a trend to lower  $VO_2$  peak among iron deficient subjects. Overall, a positive correlation was observed between  $VO_2$  peak and TSAT ( $r = 0.53$ ,  $P = 0.01$ ).

**Conclusions:** In stable HF outpatients, iron deficiency is common, while EPO production is blunted. Characterization of anemia in HF may impact in the development of new therapeutic targets to improve functional outcomes in HF.

## Introduction

Heart failure remains a prevalent and morbid condition worldwide. Despite improvements in outcomes seen in the last decades with incremental anti-neuro-hormonal strategies, annual mortality for outpatients with heart failure varies around 10%. (1) In this setting, comorbid conditions that may impact on heart failure outcomes are actively investigated as potential new therapeutic targets.

Anemia is frequently observed in patients with heart failure. Its prevalence rates vary according to cutoff values to define anemia, as well as patient's functional status. (2) Indeed, previous studies of outpatients with heart failure report anemia rates from 4% to 23%. (3-5) During hospitalization due to a heart failure decompensation episode, rates may reach 70%. (2) Regardless of patient's clinical condition, it is increasingly recognized that anemia is associated with worse outcomes in heart failure. (6) In addition, it is already known that anemia further deteriorates impaired functional capacity related to this cardiac condition. (6, 7)

There are several physiopathological mechanisms potentially involved in the genesis of anemia associated with heart failure. These include hemodilution, anemia of chronic disease, decreased renal blood flow and iron deficiency. (8, 9) In particular, iron metabolism peculiarities appear to be important to determine functional capacity of patients with heart failure, regardless of the presence of anemia. (10) Moreover, it has been progressively thought that iron metabolism may be governed by mechanisms beyond absolute iron stores quantities; indeed, availability of iron stores appears to be as important as its quantities. It is considered that iron availability needed for erythropoiesis is blunted or reduced because of inflammation. (11) Also it has been described that in patients with heart failure, there may be blunted erythropoietin production possibly caused by inflammatory cytokines

or associated with chronic kidney disease and erythropoietin resistance at target organs. (11, 12)

A low grade inflammatory status is thought to accompany heart failure across a wide spectrum of disease severity potentially modulating iron metabolism and hence anemia development. (3) Hepcidin appears to be pivotal in iron homeostasis with regards to inflammatory signals; this hormone is upregulated by pro-inflammatory cytokines and acts inhibiting duodenum iron uptake and blocks iron release by macrophages (13). As a contra-regulatory mechanism, hepcidin synthesis can be down-regulated by anemia in the presence of low iron stores, thus allowing existing iron available for erythropoiesis. (13) Few studies have approached mechanistic pathways involving iron metabolism, inflammatory status and hepcidin profile in heart failure with or without anemia.

Therefore the complex nature of the inflammatory status, iron metabolism and anemia in patients with heart failure appears particularly relevant and deserves further exploratory studies as it remains poorly studied and controversial, especially in the setting of clinically stable ambulatory patients. In this study, we explored iron metabolism profile of stable heart failure outpatients with and without anemia, and compared circulating levels of hepcidin, tumor-necrosis factor (TNF)- $\alpha$  and erythropoietin in both groups. We also investigated whether functional capacity as assessed by ergospirometric parameters is associated with the presence of anemia and/or changes in iron metabolism.

## Patients and Methods

### *Studied patients.*

In this cross-sectional study, we included stable, ambulatory heart failure patients with and without anemia. Anemia was defined as hemoglobin level inferior to 13 g/dL for males and inferior to 12 g/dL for females, according to the World Health Organization criteria. Patients were recruited between October, 2008 and April, 2010 from the Heart Failure and Transplant Outpatient Clinic at our institution, which is a tertiary care university hospital in Porto Alegre, Brazil. All enrolled subjects were older than 18 years and presented left ventricular systolic dysfunction (ejection fraction lower than 45%). Exclusion criteria were: acute coronary syndrome, acute infections, terminal renal failure (subjects under renal substitutive therapies), hypothyroidism, recent bleeding, history of acquired iron overload or hemochromatosis, chronic liver disease (alanine transaminase higher than two times the upper normal limit), autoimmune disease, serious illnesses limiting life-expectancy, or use of erythropoietin and/or iron for treatment of anemia.

Enrolled patients underwent clinical and laboratory evaluation, which included a routine biochemical profile, a complete iron panel examination and measurements of soluble transferrin receptor (sTfR), erythropoietin, hepcidin and TNF- $\alpha$ . Transferrin saturation (TSAT) was calculated as: serum iron concentration/serum total iron binding capacity (TIBC) concentration  $\times$  100. Estimated glomerular filtration rate (eGFR) was calculated according to the Modification of Diet in Renal Disease formula. (14) Functional capacity was assessed in a sub-group of patients through cardiopulmonary exercise test.

The research protocol was approved by the Ethics on Research Committee from our institution. Written, informed consent was obtained from all participants prior to study enrolment.

***Measurements of soluble transferrin receptor, erythropoietin, hepcidin and TNF- $\alpha$  levels.***

Fasting venous blood samples (15 mL) were collected into anticoagulant-free tubes after a 30-minute resting period in supine position. Samples were cold centrifuged at 4° C at 3,000 g during 20 minutes, and serum was stored frozen at – 70° C for subsequent blind analyses performed simultaneously at the end of enrolment.

Levels of sTfR were measured using ELISA kits (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA). Sensitivity for the sTfR assay is < 0.5 nmol/L, with mean intra- and interassay coefficients of variation of 5.8 and 5.8%, respectively. The soluble transferrin receptor index (sTfR-F) was determined by the following equation:  $sTfR-F = (sTfR \text{ nmol/L} \times 0.085) \log (\text{ferritin ng /mL})$ . (15) Soluble transferrin receptor values of 29.5 nmol/L or higher were interpreted as iron-deficiency. (16)

Measurements of erythropoietin were assessed by chemiluminescence immunoassay (Immulite®, DPC Diagnostic Products Co. Los Angeles, CA, USA). Sensitivity for the erythropoietin assay is 0.24 mU/mL. The equation  $\log \text{erythropoietin} = 4.460 - (0.274 \times \text{hemoglobin})$  was used to calculate the predicted erythropoietin values for a given hemoglobin level. The observed log erythropoietin levels were divided by the predicted log erythropoietin levels to obtain the observed/predicted (O/P) ratio. An O/P ratio inferior to 0.92 suggests a lower-than-

expected erythropoietin production, while values above 1.09 imply a higher-than-expected erythropoietin production. (17)

Tumor necrosis factor- $\alpha$  levels were obtained by ELISA kits (R & D Systems, Minneapolis, MN, USA) run in duplicates. Sensitivity for the TNF- $\alpha$  assay is 1.6 pg/mL with mean intra- and interassay coefficients of variation of 4.6 and 5.8%, respectively. Our intra-assay variation was 4.7%. We used our previously published data from control, healthy individuals as reference for TNF- $\alpha$  levels ( $0.6 \pm 1.9$  pg/mL) to compare to present values. (18)

Hepcidin was measured in duplicate using commercially available ELISA kits (DRG, Marburg, Germany). According to the manufacturer, sensitivity for the assay is 0.9 ng/mL, with mean intra- and interassay coefficients of variation of 6.8 and 9.2%, respectively. Our intra-assay variation was 3.5%.

### ***Cardiopulmonary exercise testing.***

Maximal functional capacity was obtained by an ergospirometric exam performed on a treadmill (INBRAMED 10200, Porto Alegre, Brazil) through an incremental exercise test and expired gas analysis, as previously described. A ramp staged protocol was used, until volitional fatigue was reached. Gas exchange and ventilatory variables were analyzed using a calibrated computer-based exercise system (Cortex Biophysik Metalyzer 3B Stationary CPX system, MI3B2.1, Leipzig, Germany). Data were obtained breath-by-breath and expressed as 15-second averages. Peak oxygen uptake ( $\text{VO}_2$ ) was defined as the highest value of oxygen consumption in the final 15-second period of exercise. Ventilatory efficiency was estimated using the relationship between minute ventilation (VE) and carbon dioxide

output ( $VCO_2$ ), by linear regression model using all data points obtained during the cardiopulmonary exercise test (CPET). (19)

*Statistical analysis.*

Continuous data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation or median and interquartile range according to distribution, while categorical variables are presented as absolute number and percentage. Continuous variables were compared by the Student  $t$  test or Mann-Whitney  $U$  test, and categorical variables by the chi-square test or Fisher exact test, as appropriate. Correlations were obtained using Pearson or Spearman coefficients, as appropriate. Logistic regression analysis was used to determine independent factors associated to the anemic status. Two-sided P values lower than 0.05 were considered statistically significant. All data were analyzed using SPSS for Windows 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).



## Results

### *Patients' characteristics.*

We studied a total of 60 heart failure outpatients, of whom 38 were anemic. Overall, patients presented moderate systolic dysfunction (left ventricular ejection fraction of  $30 \pm 8\%$ ). Mean age was  $65 \pm 11$  years-old, and around  $\frac{3}{4}$  of the population were male.

Tables 1 and 2 describe clinical and laboratory data from studied population, respectively. Patients with anemia were older, had lower body mass index (BMI) and demonstrated a higher degree of renal dysfunction. Proportion of different etiologies for heart failure was similar between anemic and non-anemic subjects, as well as prevalence of diabetes and smoking history. At the physical exam, both systolic blood pressure and pulse pressure values were higher in the anemic group. Except for jugular venous distension and hepatojugular reflux, which were more often observed among non-anemic patients, both groups presented similar frequencies of signs of congestion such as peripheral edema and pulmonary rales. No study subject had a third heart sound on cardiovascular examination. Furthermore, anemic and non-anemic patients were under similar pharmacologic therapy for heart failure, except for a higher prescription of spironolactone in the latter. Mean dose of furosemide ranged around 80 mg/day. Anticoagulant and antiplatelet did not differ between anemic status groups.

Hemoglobin levels in the anemic patients were only moderately diminished, as overall values ranged around 11g/dL. Mean corpuscular volume was within normal values in both anemic and non-anemic patients. As expected, renal function parameters were worse among anemic subjects. Although vitamin B<sub>12</sub> levels were

more elevated in the anemic group, true vitamin B<sub>12</sub> deficiency was rare in study population (two cases in anemic group).

**Table 1. Demographic and clinical characteristics of studied patients.**

<b>Variable</b>	<b>Anemia</b> (N = 38)	<b>No anemia</b> (N = 22)	<b>P</b>
Age, years	69.6 ± 9.6	58 ± 10.8	< 0.01
Gender, male	28 (74)	16 (73)	0.94
Ethnicity, Caucasian	33 (87)	17 (77)	0.27
BMI, kg/m <sup>2</sup>	24.7 ± 3.5	27 ± 5.1	0.04
NYHA functional class			
I	15 (40)	6 (27)	0.78
II	13 (34)	9 (41)	
III or IV	10 (26)	7 (32)	
Heart failure etiology			
Ischemic	16 (42)	6 (27)	0.71
Hypertensive	5 (13)	4 (19)	
Idiopathic	8 (21)	6 (27)	
Others	9 (24)	6 (27)	
Ejection fraction	30.2 ± 8.7	30.6 ± 8.1	0.89
Medical history			
Stroke	7 (18)	1 (4.5)	0.13
Myocardial infarction	15 (39.5)	4 (18)	0.09
Diabetes mellitus	18 (47.5)	8 (36)	0.40
Chronic renal disease	24 (63)	7 (32)	0.02
Hypertension	25 (66)	10 (45.5)	0.12
Atrial fibrillation	14 (37)	6 (27)	0.45
History of neoplasia	7 (8.4)	1 (4.5)	0.13

Smoking (past/present)	23 (60.5)	11 (50)	0.43
Blood pressure, mm Hg			
Systolic	127 ± 27	114 ± 20	0.05
Diastolic	74 ± 12	74 ± 11	0.85
Pulse pressure	53 ± 18	40 ± 13	< 0.01
Heart rate, beats/min	72 ± 11	70 ± 15	0.47
Heart failure signs and symptoms			
Edema	12 (32)	9 (41)	0.46
Rales	16 (42)	6 (27)	0.25
JVD/HJR	5 (13)	9 (40)	0.01
Orthopnea/PND	14 (37)	8 (36)	0.97
Medications			
ACE inhibitor or ARB	34 (89.5)	20 (91)	0.61
Beta-blocker	34 (89.5)	22 (100)	0.15
Furosemide	36 (95)	21 (95.5)	0.69
Digoxin	27 (71)	18 (82)	0.27
Spironolactone	11 (29)	13 (59)	0.02
Lipid-lowering therapy	18 (47)	12 (54.5)	0.59
Antiplatelet therapy	18 (47)	10 (45.5)	0.88
Anticoagulant therapy	8 (21)	8 (36)	0.19

**Abbreviations:** BMI, body mass index; NYHA, New York Heart Association; JVD, jugular venous distension; HJR, hepatojugular reflux; PND, paroxysmic nocturnal dyspnea; ACE, angiotensin-converting enzyme; ARB, angiotensin-receptor blocker.

**Table 2. Laboratory characteristics of studied patients.**

<b>Variable</b>	<b>Anemia</b> (N = 38)	<b>No anemia</b> (N = 22)	<b>P</b>
Hemoglobin, g/dL	11.4 ± 1	13.8 ± 1.1	< 0.01
Hematocrit, %	35.5 ± 2.8	42 ± 3.3	< 0.01
MCV, fL	91.7 ± 5.1	90.9 ± 5.7	0.60
RDW, %	14.6 ± 1.6	13.9 ± 1.4	0.12
Albumine, g/dL	4.1 ± 0.3	4.2 ± 0.3	0.46
Creatinine, mg/dL	1.4 (0.7 – 4.5)	1.15 (0.6 – 2.2)	0.04
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	53.1 ± 24.8	69.6 ± 22.8	0.01
Vitamin B <sub>12</sub> , pg/mL	498 ± 232	378 ± 178	0.05
Folic Acid, ng/mL	13 ± 4.4	12.6 ± 4.4	0.75

**Abbreviations:** MCV, mean corpuscular volume; RDW, red cell distribution width; eGFR, estimated glomerular filtration rate.

### ***Iron metabolism parameters and erythropoietin values.***

Iron metabolism parameters and erythropoietin values are described in Table 3. Among analyzed iron metabolism variables, we observed that ferritin levels were within normal range, regardless of anemia status. However, anemic patients tended to have abnormally low levels of TSAT. No differences were noted in levels of TIBC, sTfR-F (median 1.4 in anemic and 1.1 in non-anemic, P = 0.08) and sTfR, the latter being elevated in both groups with a trend towards higher values in patients with anemia.

Median erythropoietin values were similar between patients with anemia and without anemia, with values within normal range. However, erythropoietin O/P ratio was found to be abnormally low in anemic subjects, which was significantly different

from non-anemic patients. Fifty-seven percent of the anemic group presented an O/P ratio lower than 0.92, cutoff that suggests a lower-than-expected erythropoietin production. (17) Furthermore, we observed a strong correlation between erythropoietin O/P ratio and hemoglobin values ( $r = 0.75$ ,  $P < 0.01$ ) and a trend towards association with  $eGFR < 60$  mL/min;  $P = 0.08$  by chi-square.

**Table 3. Iron and erythropoietin metabolism parameters.**

<b>Variable</b>	<b>Anemia</b> (N = 38)	<b>No anemia</b> (N = 22)	<b>P</b>
Ferritin, ng/mL	168 (31 – 776)	231 (21 – 1473)	0.24
Iron, $\mu$ g/dL	68.5 $\pm$ 28.4	88.2 $\pm$ 27.4	0.01
TSAT, %	21.5 $\pm$ 9.1	26.2 $\pm$ 9.2	0.06
TIBC, $\mu$ g/dL	317 $\pm$ 62	345 $\pm$ 59	0.09
sTfR, nmol/L	38.3 (19.3 – 117.7)	32.7 (17.2 – 99.1)	0.07
Erythropoietin, mUI/mL	19.2 (3.1 – 86.9)	21.1 (7.0 – 80.4)	0.85
Erythropoietin O/P ratio	0.8 (0.3 – 1.3)	1.4 (0.7 – 7.0)	< 0.01

**Abbreviations:** TSAT, transferrin saturation; TIBC, total iron binding capacity; sTfR, soluble transferrin receptor; O/P ratio, erythropoietin observed/predicted ratio.

Iron deficiency prevalence according to different laboratory parameters is described in Table 4. Ferritin, which is the main diagnostic test for iron deficiency in patients with no chronic diseases, was able to detect only four subjects with abnormally low levels. On the other hand, both TSAT lower than 20% and FAIR-HF trial criteria for iron deficiency (10, 20), commonly employed to evaluate iron supply in chronic renal impairment scenario, increased proportions of iron deficiency patients. Measurement of sTfR identified an even higher percentage of impaired iron metabolism. Finally, the presence of at least one positive test for iron deficiency was observed in 75% of study population, denoting a high rate of iron deficiency erythropoiesis. The clinical utility of the association of different laboratory parameters for the diagnosis of iron functional deficiency, regardless of anemia is illustrated in the Figure.

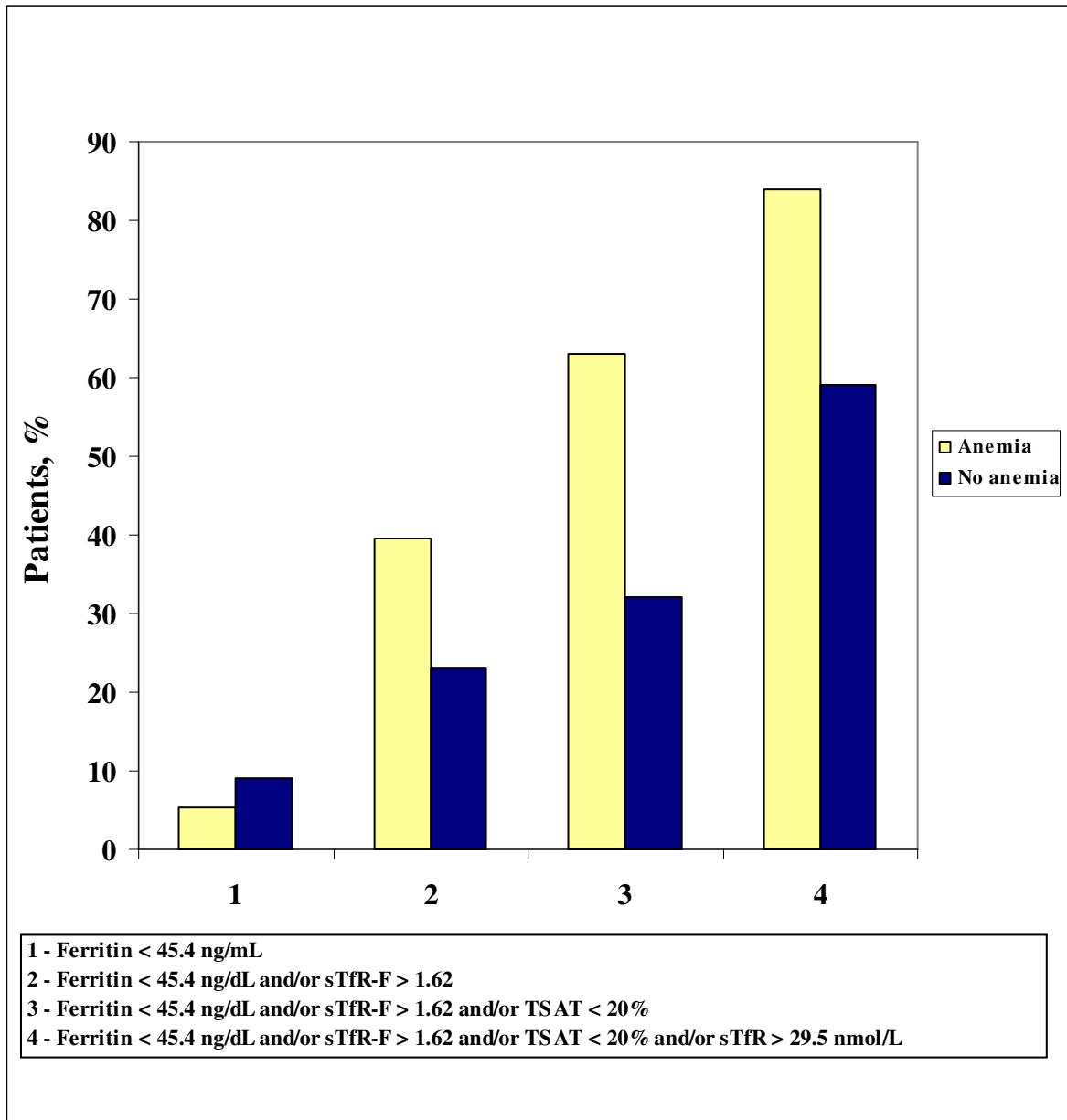
**Table 4. Iron deficiency prevalence in study population according to different laboratory parameters\*.**

<b>Variable</b>	<b>Anemia</b> (N=38)	<b>No anemia</b> (N=22)	<b>P</b>
Ferritin < 45.4 ng/mL (21)	2 (5.5)	2 (9)	0.47
TSAT < 20% (20)	20 (53)	6 (27)	0.05
Ferritin < 100 ng/mL or Ferritin 100–299 ng/mL and TSAT < 20% (10)	16 (42)	6 (27)	0.25
sTfR > 29.5 nmol/L (16)	29 (76)	12 (54.5)	0.26
sTfR-F > 1.62 (21)	14 (37)	5 (23)	0.08
Presence of any of the above parameters	32 (84)	13 (59)	0.03

**Abbreviations:** TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F, soluble transferrin receptor index.

\*Cutoff points suggested for the diagnosis of iron deficiency in patients with anemia of chronic disease.





**Figure. Iron deficiency prevalence according to different laboratory parameters.**

**Abbreviations:** TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; sTfR-F, soluble transferrin receptor index.

***Levels of TNF- $\alpha$  and hepcidin.***

Overall, patients had a low grade inflammatory profile, as judged by TNF- $\alpha$  values, which remained within normal range according to the commercial ELISA manufacturer assay. However, levels of this cytokine in the studied population were over five times higher than historical healthy controls' measurements from our laboratory. (18) Moreover, a significant difference was observed between groups, as patients with anemia had a 29% increase in TNF- $\alpha$  levels compared to non anemic patients ( $7.7 \pm 3.6$  vs.  $5.5 \pm 2.6$  pg/mL, respectively;  $P = 0.02$ ). Also, we observed a moderate correlation between TNF- $\alpha$  levels and eGFR considering the entire study group ( $r = -0.43$ ;  $P < 0.01$ ).

Hepcidin levels were also different between groups. Anemic patients showed hepcidin values that were 21% higher than those from patients without anemia ( $39 \pm 13$  vs.  $31.6 \pm 10.7$  ng/mL, respectively;  $P = 0.03$ ). Finally, there was no correlation between those two variables ( $r = 0.05$ ;  $P = 0.67$ ).

***Multivariate analysis.***

In logistic regression analysis, multivariate models to identify laboratory tests associated with the presence of anemia were adjusted for age and BMI, as depicted in Table 5. Variables independently associated to the occurrence of anemia were TSAT, sTfR and erythropoietin O/P ratio. The cutoff of 0.92 or lower for the latter was the strongest parameter associated to the occurrence of anemia in studied subjects. There was a trend towards higher TNF- $\alpha$  levels among patients with anemia. Hepcidin values, however, were not significantly associated to anemia in the multivariate analysis.

**Table 5. Laboratory variables independently associated to anemia in study population\*.**

<b>Variable</b>	<b>OR</b>	<b>CI 95%</b>	<b>P</b>
TSAT, %	0.93	0.86 – 0.99	0.04
sTfR > 29.5 nmol/L	5.1	1.1 – 22.9	0.03
Erythropoietin O/P ratio < 0.92	8.3	1.3 – 51.1	0.02
eGFR, mL/min/1.73m <sup>2</sup>	0.97	0.9 – 1.0	0.08
TNF- $\alpha$ , pg/mL	1.2	0.9 – 1.5	0.06
Hepcidin, ng/mL	1.0	0.9 – 1.1	0.14

**Abbreviations:** OR, odds ratio; CI, confidence interval; TSAT, transferrin saturation; sTfR, soluble transferrin receptor; O/P ratio, erythropoietin observed/predicted ratio; eGRF, estimated glomerular filtration rate; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor alpha.

\*Covariates were adjusted for age and body mass index in the model.

***Functional capacity implications of anemia and iron deficiency.***

A subgroup of 20 patients underwent cardiopulmonary exercise test. Half of them were anemic. Overall, patients had moderate functional impairment ( $\text{VO}_2$  peak of  $17.7 \pm 6.0 \text{ mL/kg}^{-1}/\text{min}^{-1}$ ). Although  $\text{VO}_2$  peak was not significantly different amongst groups, we observed changes in ventilatory efficiency parameters. A significant positive correlation was observed between  $\text{VO}_2$  peak and TSAT ( $r = 0.53$ ;  $P = 0.01$ ). Table 6 demonstrates main cardiopulmonary exercise test parameters according to anemia status.

When patients were categorized according to iron metabolism status, there was a trend to lower  $\text{VO}_2$  peak among iron deficiency patients ( $15.1 \pm 2.9$  vs.  $19.5 \pm 7.0 \text{ mL/kg}^{-1}/\text{min}^{-1}$ ;  $P = 0.07$ ).

**Table 6. Maximal cardiopulmonary exercise test parameters.**

<b>Variable</b>	<b>Anemia</b> (N = 10)	<b>No anemia</b> (N = 10)	<b>P</b>
Peak exercise			
$\text{VO}_2$ peak $\text{mL/kg}^{-1}/\text{min}^{-1}$	$16.9 \pm 6.0$	$19.8 \pm 6.8$	0.32
R peak	$1.0 \pm 0.07$	$1.0 \pm 0.07$	0.71
Ventilatory efficiency			
VE/ $\text{VCO}_2$ slope	$39.1 \pm 7.5$	$32.1 \pm 6.3$	0.03

**Abbreviations:**  $\text{VO}_2$ , oxygen uptake; R, respiratory exchange ratio; VE/ $\text{VCO}_2$  slope, relationship between changes in minute ventilation (VE) and carbon dioxide output ( $\text{VCO}_2$ ) during incremental exercise.

## DISCUSSION

The main finding of our study is that, in clinically stable outpatients with systolic heart failure and anemia, iron deficiency is common and erythropoietin production is blunted. We also found that even in the absence of anemia, important portion of patients had iron deficiency. Finally, although levels of TNF- $\alpha$  and hepcidin were elevated in our patients, they were not independently associated with anemia.

### *Characteristics of studied patients.*

Several studies have addressed anemia in the setting of heart failure, often including both systolic and diastolic heart failure (11), stable and decompensated clinical scenario. (8, 9, 17, 22, 23) Our study, however, focused on stable patients, with moderate to severe systolic dysfunction and chronic anemia of any cause. Different from other important descriptive studies in the area (9, 11), we established a comparison group of patients with heart failure without anemia, which have been allocated from the same cohort. Thus, we were able to approach pathogenesis of anemia in a comprehensive manner, in a well matched group of patients with heart failure with and without anemia.

Our study patients had mild anemia, less advanced NYHA functional class but moderate to severe renal dysfunction was frequent. Also, as judged by traditional protocol-based physical exam findings (24) and by relatively low dosage of daily furosemide, it is unlikely that our patients had significant degrees of congestion. These characteristics separate out our study population from those of other similar studies, where hospitalized and pre-heart transplantation patients (9, 11, 22, 23) or outpatients with only mild renal dysfunction were included. (8)

***Iron metabolism.***

To our knowledge we were the first to investigate aspects relative to iron metabolism, including sTfR and hepcidin together with TNF- $\alpha$  levels. Iron deficiency may be important in heart failure, with cellular/muscular implications (25), even in the absence of anemia. (26) Nanas and colleagues have demonstrated that 73% of patients with heart failure had ferropenic anemia according to bone marrow aspirates (9) In our study, we investigated iron availability for erythropoiesis through indirect methods, considering the peculiarities of heart failure patients, in particular. For instance, ferritin which is traditionally used to assess iron metabolism, may be abnormally elevated in the setting of heart failure, due to an inflammatory-like status. (27) However, median levels of ferritin in our study sample was not elevated, suggesting that the inflammatory burden might not be significant. Nonetheless we thus studied sTfR, which help to determine iron deficiency, irrespective of the presence of inflammation, and found elevated levels. Opasich and colleagues also observed increased sTfR levels in patients with anemia and heart failure, but unlike our study, did not have a group without anemia as comparators. (11) These authors also demonstrated that amongst patients with inflammation-related anemia, 63% had criteria (low TSAT or high sTfR) compatible with low iron status. (11) Lastly, Albrecht and colleagues, whose study population shared several similarities with ours, detected a much lower iron deficiency prevalence (only 26% of patients with anemia), according to criteria that included ferritin < 30 ng/dL or TSAT < 15%. (8) However, this low prevalence may result from exceedingly rigid criteria for iron deficiency, which may not necessarily represent usual clinical practice, at least in the presence of inflammatory states. In addition, hemodilution was the strongest

predictor of anemia (8), a feature unlikely significant in our stable ambulatory patients.

Iron status may be of singular relevance for functional capacity in patients with heart failure. (10) According to two important clinical trials, i.v. iron supplementation, irrespective of the presence of anemia, caused improvement in functional class and quality of life scores. (10, 26) Noteworthy, in our study 69% of patients had iron deficiency, according to FAIR-HF criteria. Our data re-inforce the importance of a comprehensive approach to detect iron abnormalities in heart failure.

#### ***Erythropoietin levels and erythropoietin expected/observed ratio.***

It has been demonstrated that the majority of patients with heart failure and anemia have increased circulating levels of erythropoietin, however, a consistent degree of blunted production of erythropoietin as expected due to the degree of anemia, is also seen. (17) In the study by Opasich and co-workers, blunted erythropoietin production was observed in 76% of the patients with anemia inflammation-related only. (11) Others have shown blunted erythropoietin production in around 30 to 40% of patients with heart failure in more advanced functional classes (NYHA classes III-IV) and/or with preserved renal function. (8, 17) Different factors are thought to modulate erythropoietin synthesis, including cytokines (28), renal dysfunction (12) and use of ACE inhibitors. (29) While in the present study no difference in erythropoietin levels was observed amongst anemic and non anemic patients, we demonstrated that blunted erythropoietin production was evident in 57% of the anemic group. Moreover, the erythropoietin O/P ratio 0.92 cutoff point was the strongest independent predictor of anemia in the entire study group. Finally, a trend was observed between blunted erythropoietin production and

impaired renal function. Taking our erythropoietin data together, it partially supports the notion that renal homeostasis is relevant to prevent anemia development further along.

### ***Inflammation and hepcidin.***

Anemia related to heart failure has been seen as associated with the heart failure inflammatory *milieu*. (11) We chose to study TNF- $\alpha$  as a marker of inflammation. We showed that patients with anemia had increased levels of this cytokine compared to patients without anemia, although values were relatively modest, which was similar to values from other studies on stable, outpatients with heart failure. (30) The study by Opasich and colleagues has also shown increased levels of TNF- $\alpha$  which was different compared to historical controls. (11) However, our data further demonstrated that when levels of TNF- $\alpha$  were adjusted for age and BMI, it no longer remained independently associated with anemia. We also demonstrated that increased levels of TNF- $\alpha$  was associated to worse renal function, perhaps indicating that in the presence a low grade of inflammation, other factors may influence both TNF- $\alpha$  and anemia in heart failure, diminishing the causal impact of one over the other.

In the setting of an inflammatory scenario, hepcidin inhibits iron release from the reticuloendothelial system and iron absorption by the gut. (13) During ferropenia, its levels decrease allowing iron availability for erythropoiesis. (13) Matsumoto and colleagues have shown decreased levels of hepcidin in patients with anemia and heart failure indicating that low iron stores prevails to dictate hepcidin turnover, at least in the setting of patients admitted because of decompensated heart failure. (23)



On the other hand, Albrecht and collaborators showed no difference in levels of pro-hepcidin in patients with heart failure with and without anemia. (8)

Our study adds novel information as it measured hepcidin together with a comprehensive iron metabolism panel in parallel with another traditional marker of inflammation, TNF- $\alpha$ . We pioneered demonstrating that hepcidin was elevated in patients with anemia, and similarly to the pattern observed with TNF- $\alpha$ , after adjustment for age and BMI, hepcidin failed to remain associated with anemia. Furthermore, we also did not demonstrate a positive association between hepcidin and TNF- $\alpha$ , in keeping with the lack of association found in Matsumoto's report with regards to the behavior of hepcidin and yet another cytokine, IL-6. (23). In addition, we did not find association between hepcidin levels and different iron metabolism parameters. Clearly, there is ground for further, larger studies involving hepcidin and the study of pathogenesis of anemia of heart failure.

### ***Functional implications.***

Considering the functional implications of anemia and/or iron deficiency (26), as well as the impact of its treatment (10, 26), we identified a sub group of patients who had ergospirometry tests contemporaneously performed while taking part in our study protocol. Only one previous study assessing anemia in heart failure patients, had peak  $VO_2$  values reported which ranged around 13 mL/kg/min, compatible with pre-cardiac transplantation criteria. (22) While without reaching statistical significance, in our stable outpatients we were able to show that patients with anemia had peak  $VO_2$  values 15% lower than patients without anemia. In addition, VE/ $VCO_2$  slope was significantly different amongst groups, indicating that patients with anemia had functional limitation dictated predominantly by its

circulatory component, rather than ventilatory. Furthermore, when patients were categorized according to iron stores status, those with iron deficiency, irrespective of anemia, had significantly lower  $VO_2$  values. Although limited by a very small sample size, these data support the notion that reversal of anemia or iron deficiency as suggested by recent clinical trials (26, 31), may have physiopathological basis, and portraits potential for new venues in heart failure management.

### ***Study limitations.***

Our data should be viewed under certain technical considerations. This is a cross sectional study; as such, the dynamic nature of anemia in heart failure, as it may relates to congestion status, for example, was not addressed as hemodilution was not formally assessed. The relatively small sample size may have limited our power to detect associations running multivariate analysis, but we carefully restricted the inclusion in the statistical modeling of only those variables considered clinically relevant. Also, the magnitude of changes of inflammatory markers was mild, remaining technically within normal range, although different amongst patients with and without anemia. This may have limited the potential to uncover relevant associations between  $TNF-\alpha$  and hepcidin with other iron variables. Finally, iron stores were not evaluated by bone marrow aspirates. We sought for less invasive and innovative methods such as sTfR to detect iron status.

### ***Conclusions.***

We showed that in stable, outpatients with heart failure and anemia, iron deficiency is markedly present as well as blunted erythropoietin production. Moreover, iron deficiency was also seen in patients without anemia. In addition, our

data demonstrates that although elevated levels of TNF- $\alpha$  and hepcidin were noted in patients with anemia, values were only modestly increased, and were not independently associated with anemia, indicating that low grade inflammation associated with heart failure may not govern anemia mechanisms. Finally, both anemia and iron deficiency appear to underscore impaired functional capacity of patients with heart failure.

Taking together our data indicate a predominant role of iron-related mechanisms in the pathogenesis of anemia in heart failure, when compared to inflammation-related mechanisms, and set the stage for future research aiming at appropriate management of both iron deficiency and ferropenic anemia to improve exercise capacity and quality of life of patients with heart failure.

### *Acknowledgements*

We are thankful to the Medical Undergraduate students Bruno Schneider, Stephan Soder, Andressa de Azeredo and Juliana Szymanski for their support to allocate patients to participate in the study and their diligent work to gather the information needed for the study database. We also thank Gabriela Souza and Paula Ribeiro for their help to gather and analyze ergospirometric data, respectively. This study was supported by Research Grant from Hospital de Clínicas de Porto Alegre to Dr. Clausell.

## REFERENCES

1. Pons F, Lupon J, Urrutia A, et al. Mortality and cause of death in patients with heart failure: findings at a specialist multidisciplinary heart failure unit. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63(3):303-14.
2. Anand IS. Anemia and chronic heart failure implications and treatment options. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(7):501-11.
3. Tang YD, Katz SD. Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation*. 2006;113(20):2454-61.
4. Berry C, Hogg K, Norrie J, Stevenson K, Brett M, McMurray J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function: a hospital cohort study. *Heart*. 2005;91(7):907-13.
5. Tang WH, Tong W, Jain A, Francis GS, Harris CM, Young JB. Evaluation and long-term prognosis of new-onset, transient, and persistent anemia in ambulatory patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2008;51(5):569-76.
6. Ezekowitz JA, McAlister FA, Armstrong PW. Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure. *Circulation*. 2003;107(2):223-5.
7. Yasaka Y, Yamabe H, Yokoyama M. Dependence of peak oxygen uptake on oxygen transport capacity in chronic heart failure: comparison of graded protocol and fixed protocol. *Int J Cardiol*. 1997;59(2):149-56.
8. Adlbrecht C, Kommata S, Hulsmann M, et al. Chronic heart failure leads to an expanded plasma volume and pseudoanaemia, but does not lead to a reduction in the body's red cell volume. *Eur Heart J*. 2008;29(19):2343-50.

9. Nanas JN, Matsouka C, Karageorgopoulos D, et al. Etiology of anemia in patients with advanced heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(12):2485-9.
10. Anker SD, Comin Colet J, Filippatos G, et al. Ferric carboxymaltose in patients with heart failure and iron deficiency. *N Engl J Med*. 2009;361(25):2436-48.
11. Opasich C, Cazzola M, Scelsi L, 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.
12. Westenbrink BD, Visser FW, Voors AA, et al. Anaemia in chronic heart failure is not only related to impaired renal perfusion and blunted erythropoietin production, but to fluid retention as well. *Eur Heart J*. 2007;28(2):166-71.
13. Ganz T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2006:29-35, 507.
14. Levey AS, Bosch JP, Lewis JB, Greene T, Rogers N, Roth D. A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation. Modification of Diet in Renal Disease Study Group. *Ann Intern Med*. 1999;130(6):461-70.
15. Koulaouzidis A, Saeed AA, Abdallah M, Said EM. Transferrin receptor level as surrogate peripheral blood marker of iron deficiency states. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44(1):126-7.
16. Koulaouzidis A, Said E, Cottier R, Saeed AA. Soluble transferrin receptors and iron deficiency, a step beyond ferritin. A systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2009;18(3):345-52.

17. van der Meer P, Lok DJ, Januzzi JL, et al. Adequacy of endogenous erythropoietin levels and mortality in anaemic heart failure patients. *Eur Heart J*. 2008;29(12):1510-5.
18. Grossman GB, Rohde LE, Clausell N. Evidence for increased peripheral production of tumor necrosis factor-alpha in advanced congestive heart failure. *Am J Cardiol*. 2001;88(5):578-81.
19. Dall'Ago P, Chiappa GR, Guths H, Stein R, Ribeiro JP. Inspiratory muscle training in patients with heart failure and inspiratory muscle weakness: a randomized trial. *J Am Coll Cardiol*. 2006;47(4):757-63.
20. Wish JB. Assessing iron status: beyond serum ferritin and transferrin saturation. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2006;1 Suppl 1:S4-8.
21. Park G, Park CY, Jang SJ, Moon DS, Park SM, Park YJ. Soluble transferrin receptor-ferritin index and estimated body iron in iron-deficiency anemia in "select" chronic diseases. *Ann Hematol*. 2009;88(9):913-5.
22. Androne AS, Katz SD, Lund L, et al. Hemodilution is common in patients with advanced heart failure. *Circulation*. 2003;107(2):226-9.
23. Matsumoto M, Tsujino T, Lee-Kawabata M, et al. Iron regulatory hormone hepcidin decreases in chronic heart failure patients with anemia. *Circ J*. 2010;74(2):301-6.
24. Rohde LE, Beck-da-Silva L, Goldraich L, et al. Reliability and prognostic value of traditional signs and symptoms in outpatients with congestive heart failure. *Can J Cardiol*. 2004;20(7):697-702.
25. Naito Y, Tsujino T, Matsumoto M, Sakoda T, Ohyanagi M, Masuyama T. Adaptive response of the heart to long-term anemia induced by iron deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;296(3):H585-93.

26. Okonko DO, Grzeslo A, Witkowski T, et al. Effect of intravenous iron sucrose on exercise tolerance in anemic and nonanemic patients with symptomatic chronic heart failure and iron deficiency FERRIC-HF: a randomized, controlled, observer-blinded trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51(2):103-12.
27. Thomas C, Thomas L. Biochemical markers and hematologic indices in the diagnosis of functional iron deficiency. *Clin Chem.* 2002;48(7):1066-76.
28. Jelkmann W. Proinflammatory cytokines lowering erythropoietin production. *J Interferon Cytokine Res.* 1998;18(8):555-9.
29. van der Meer P, Lipsic E, Westenbrink BD, et al. Levels of hematopoiesis inhibitor N-acetyl-seryl-aspartyl-lysyl-proline partially explain the occurrence of anemia in heart failure. *Circulation.* 2005;112(12):1743-7.
30. Torre-Amione G, Kapadia S, Benedict C, Oral H, Young JB, Mann DL. Proinflammatory cytokine levels in patients with depressed left ventricular ejection fraction: a report from the Studies of Left Ventricular Dysfunction (SOLVD). *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(5):1201-6.
31. Mancini DM, Katz SD, Lang CC, LaManca J, Hudaihed A, Androne AS. Effect of erythropoietin on exercise capacity in patients with moderate to severe chronic heart failure. *Circulation.* 2003;107(2):294-9.

## CONSIDERAÇÕES GERAIS

O principal resultado do nosso estudo foi o de observar uma alta taxa de deficiência de ferro e produção atenuada de EPO em pacientes com IC sistólica e anemia, em acompanhamento ambulatorial e com quadro clínico estável. Também foi observado que uma fração considerável dos pacientes sem anemia apresentou alterações laboratoriais compatíveis com deficiência de ferro. O marcador inflamatório TNF- $\alpha$  e a hepcidina apesar de maiores no grupo dos anêmicos não foram preditores para a presença de anemia.

Estudamos um grupo de pacientes com IC estáveis, com disfunção sistólica moderada a severa e presença de anemia. Ao contrário de outros estudos também avaliamos um grupo controle de pacientes com características semelhantes, mas sem anemia para desta maneira possibilitar uma melhor caracterização da anemia na IC.

Os pacientes do nosso estudo apresentaram anemia leve (Hb em torno de 11 mg/dL), classe funcional menos avançada (74% classes I e II), e 63% com critérios para doença renal crônica. Baseado em achados do exame físico e na dose de diurético em uso, os pacientes não apresentaram graus importantes de congestão. Ao contrário do nosso estudo a maioria dos trabalhos que avaliou a fisiopatologia da anemia na IC avaliou pacientes hospitalizados, com quadros de IC avançada ou pacientes ambulatoriais sem disfunção renal.

Com relação às alterações no metabolismo do ferro, avaliamos nossos pacientes através de métodos indiretos para quantificação do ferro disponível para a eritropoese. Excluindo o uso da dosagem de ferritina como diagnóstico para presença de deficiência de ferro, tendo em vista que não é um bom marcador para esse diagnóstico em pacientes com quadros de inflamação crônica, encontramos uma alta



taxa de ferropenia nos pacientes com anemia e uma taxa moderada nos pacientes sem anemia. Esse fato é importante tendo em vista que ensaios clínicos realizados recentemente com reposição de ferro parenteral em pacientes com IC e deficiência de ferro mostraram além de um aumento na Hb, uma melhora na capacidade funcional e escores de qualidade de vida dos pacientes estudados.

Não observamos no nosso estudo diferença nos níveis de EPO entre o grupo de pacientes com e sem anemia. No entanto, encontramos a presença de produção atenuada de EPO em 57% dos pacientes com anemia, quantificada através da taxa EPO O/P, que foi o principal fator preditor para a ocorrência de anemia nos pacientes avaliados. Também encontramos uma tendência a associação de uma pior função renal com maior presença de produção atenuada de EPO, o que corrobora a importância da manutenção de uma homeostasia renal adequada nesses pacientes.

Apesar dos nossos pacientes com anemia terem apresentados níveis elevados de TNF- $\alpha$  e hepcidina quando em comparação com o grupo de pacientes controles sem anemia, esses marcadores não foram preditores para a ocorrência de anemia na análise multivariada, o que indica que talvez, a presença de uma inflamação crônica leve nesses pacientes não seja o principal fator associado com a gênese da anemia como pensado previamente. Ainda com relação à hepcidina, peptídeo que regula a homeostasia do ferro, não encontramos correlação da mesma com marcadores do metabolismo do ferro ou TNF- $\alpha$ .

Em um subgrupo de pacientes que realizaram avaliação da capacidade funcional observamos um pico de  $VO_2$  15% menor nos pacientes com anemia quando comparados aos sem anemia e também menor no grupo de pacientes com TSAT < 20% quando comparados com TSAT > 20%. Embora esses valores não tenham apresentado significância estatística, provavelmente pelo pequeno tamanho

da amostra estudada, essas alterações levantam em questão um ponto importante quando pensamos nos benefícios que podem ser trazidos com o tratamento da anemia no pacientes com IC.

Por fim, mostramos que em pacientes com IC sistólica estáveis, com anemia e em acompanhamento ambulatorial, houve uma taxa elevada de deficiência de ferro e produção atenuada de EPO. Também nossos dados sugerem que a presença de anemia ou deficiência de ferro estão associadas a uma pior capacidade funcional nesses pacientes. Isso abre perspectivas para novos estudos tanto no sentido de elucidar cada vez mais a fisiopatologia da anemia em pacientes com IC quanto com relação ao melhor tratamento que pode ser oferecido para os mesmos.

## ANEXOS

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Estamos realizando um projeto de pesquisa no Hospital de Clínicas de Porto Alegre e gostaríamos de contar com a sua ajuda.

O objetivo deste estudo é descobrir as causas de anemia nos pacientes com insuficiência cardíaca para possibilitar um melhor tratamento.

Para participar o Sr(a). será submetido a coleta de amostra de sangue realizada através da punção de uma veia periférica. Este procedimento pode provocar dor e desconforto no local da punção e, eventualmente, uma pequena mancha roxa, que tende a desaparecer em poucos dias.

Todas as informações obtidas neste estudo serão absolutamente confidenciais e para fins exclusivos de pesquisa. Se desejar, o Sr(a). ou qualquer médico a seu critério poderá ter acesso aos resultados dos exames realizados.

Em qualquer momento o Sr(a) poderá sair do estudo sem que isto prejudique o seu tratamento e acompanhamento no ambulatório.

O comitê de ética deste hospital já aprovou o projeto, se necessárias outras explicações, as pesquisadoras Nadine Clausell e Cristiane Weber estarão a seu dispor nos telefones (51) 21018304 e (51) 92490862.

Eu, \_\_\_\_\_ aceito participar deste estudo tendo sido informado(a) previamente de suas características e potenciais riscos.

---

Assinatura do paciente

---

Assinatura do pesquisador responsável

Porto Alegre, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Questionário de coleta de dados

Iniciais: \_\_\_\_\_ No. Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

Sexo: 1 ( ) Masculino 2 ( ) Feminino

Raça: 1 ( ) Branco 2 ( ) Negro 3 ( ) Pardo 4 ( ) Outra

#### EXAME FÍSICO

Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_ FC: \_\_\_\_\_ PA: \_\_\_\_\_ x \_\_\_\_\_

Classe funcional NYHA: 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( )

B3: 0 ( ) não 1 ( ) sim

RHJ 0 ( ) não 1 ( ) sim TJ: 0 ( ) não 1 ( ) sim

Crepitantes: 0 ( ) não 1 ( ) sim

Edema periférico: 0 ( ) não 1 ( ) sim

Ortopnéia: 0 ( ) não 1 ( ) sim DPN: 0 ( ) não 1 ( ) sim

#### ETIOLOGIA DA IC

1 ( ) Isquêmica 2 ( ) Hipertensiva 3 ( ) Idiopática 4 ( ) Outra \_\_\_\_\_

#### COMORBIDADES

AVC 0 ( ) não 1 ( ) sim D. renal 0 ( ) não 1 ( ) sim

Neoplasia 0 ( ) não 1 ( ) sim HAS 0 ( ) não 1 ( ) sim

IAM 0 ( ) não 1 ( ) sim Fib atrial 0 ( ) não 1 ( ) sim

DM 0 ( ) não 1 ( ) sim Dislipidemia 0 ( ) não 1 ( ) sim

Iniciais: \_\_\_\_\_ No. Prontuário: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

EXAMES LABORATORIAIS

Hb: \_\_\_\_\_ Ur: \_\_\_\_\_ Sat transf: \_\_\_\_\_  
 Ht: \_\_\_\_\_ TGO: \_\_\_\_\_ Tranferrina: \_\_\_\_\_  
 VCM: \_\_\_\_\_ TGP: \_\_\_\_\_ C. ferropéxica: \_\_\_\_\_  
 RDW: \_\_\_\_\_ FA: \_\_\_\_\_ B12: \_\_\_\_\_  
 CHCM: \_\_\_\_\_ GGT: \_\_\_\_\_ Folato: \_\_\_\_\_  
 HCM: \_\_\_\_\_ BT: \_\_\_\_\_ EPO: \_\_\_\_\_  
 Leuc: \_\_\_\_\_ TP: \_\_\_\_\_ Hepcidina: \_\_\_\_\_  
 Plaç: \_\_\_\_\_ TSH: \_\_\_\_\_ sTfR: \_\_\_\_\_  
 Albumina: \_\_\_\_\_ Ferro: \_\_\_\_\_ TNF- $\alpha$ : \_\_\_\_\_  
 Cr: \_\_\_\_\_ Ferritina: \_\_\_\_\_

ECOCARDIOGRAMA FE: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

MEDICAMENTOS

IECA: 1. Captopril (\_\_\_\_\_) 2. Enalapril (\_\_\_\_\_) 3. Outro \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Beta-bloqueador: 1. Metoprolol tartarato \_\_\_\_\_ 2. Metoprolol Succinato \_\_\_\_\_  
 3. Carvedilol \_\_\_\_\_ 4. Outro \_\_\_\_\_

Espironolactona: \_\_\_\_\_ Furosemeide: \_\_\_\_\_

Digoxina: \_\_\_\_\_ HCTZ: \_\_\_\_\_

BRAII: 1. Losartan \_\_\_\_\_ 2. Valsartan \_\_\_\_\_ 3. Outro \_\_\_\_\_

Estatina: 1. Sinvastatina \_\_\_\_\_ 2. Atorvastatina \_\_\_\_\_ 3. Outro \_\_\_\_\_

Outros medicamentos: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_