

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO RS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES IDOSOS COM
ANEMIA FERROPÊNICA**

Dissertação de Mestrado

Aline Coghetto Baccin

Porto Alegre, novembro de 2008.

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular
Centro de Biotecnologia no Estado do Rio Grande do Sul**

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO EM PACIENTES IDOSOS COM
ANEMIA FERROPÊNICA**

Aline Coghetto Baccin

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular
da UFRGS como requisito
parcial para a obtenção do
grau de Mestre em Biologia
Celular e Molecular

Orientadora: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato

Porto Alegre, novembro de 2008

Este trabalho foi realizado no laboratório de Estresse Oxidativo no Departamento de Biofísica da UFRGS.

À Deus que sempre me iluminou!

AGRADECIMENTOS

Chegou a hora de agradecer àquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho. Pessoas que me incentivaram de diferentes maneiras. A todos vocês o meu sincero “MUITO OBRIGADO”!

À Deus, sem ele nada seria possível na minha vida.

Aos meus pais, Luiz e Nelsa que investiram e acreditaram no meu potencial, proporcionaram-me o estudo e ensinaram-me que sem sacrifício e perseverança nada conseguimos e, acima de tudo por terem me dado o apoio que precisava.

Ao meu marido, companheiro e amigo Marcelo, pelo amor, apoio e compreensão nas horas de ausência. Agradeço por você fazer parte da minha vida. Você foi muito importante nessa etapa! Te amo!

Agradeço também ao meu irmão pelas palavras de incentivo e amizade.

Quero agradecer a minha orientadora, professora Dra. Mara Benfato, pela confiança depositada em mim e pelos ensinamentos ao longo destes dois anos.

À comissão de acompanhamento, professor Dr. Rafael Roesler e professor Dr. Tarso Kirst, pela disponibilidade e atenção.

À professora Dra. Patrícia Valente, pela disponibilidade em corrigir o artigo, e a dissertação, que com certeza você contribuiu para melhorá-los.

À professora Dra. Maria do Carmo, do Instituto de Química (UFRGS) pelo uso de equipamentos e reagentes.

A universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – campus Erechim, por me proporcionar grandes ensinamentos e pela minha participação no projeto de atenção farmacêutica, sem esse nada teria acontecido.

A todos os profissionais de saúde que me ajudaram nas coletas, pelo empenho e parceria para a realização deste projeto.

Quero fazer um agradecimento muito especial a minha amiga Vanusa Manfredini, que foi quem me incentivou a começar o mestrado. Foi mais que uma irmã, foi amiga, companheira, incentivadora e muito paciente. Serei grata eternamente!

Também agradeço a todos as amigas do Laboratório de Estresse Oxidativo, em especial à Vanessa Brandão, Luisa Lazzaretti e Cristini Klein. Obrigado meninas, pela ajuda no desenvolvimento do trabalho, e também pelos momentos alegres que vivemos juntas.

Agradeço à Sílvia e ao Luciano da Secretaria do PPGBCM, pela atenção e disponibilidade em me atender, sempre com bom humor.

E a todas as demais pessoas que, embora não ilustradas, também contribuíram na execução desse trabalho. Mas principalmente aos voluntários que aceitaram participar da pesquisa.

SUMÁRIO

CONTEÚDO	Pág.
RESUMO	9
ABSTRACT	10
1. INTRODUÇÃO	11
1.1 O idoso no contexto social	11
1.2 Anemia	13
1.2.1 Anemia no idoso	14
1.2.2 Causas de anemia no idoso	16
1.3 Ferro e o seu metabolismo	19
1.3.1 Deficiência de ferro	23
1.4 Estresse Oxidativo	24
1.4.1 Oxidação de eritrócitos	26
1.4.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos	27
1.4.3 Estresse oxidativo na anemia ferropênica	30
2. OBJETIVOS	31
2.1 Objetivo Geral	31
2.2 Objetivos Específicos	31
3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS	32
3.1 Artigo Científico	33
3.2 Material e Métodos Suplementares	51
3.3 Resultados Suplementares	55
4. DISCUSSÃO	59
5. PERSPECTIVAS DO ESTUDO	65
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
ANEXO 1 Termo de Consentimento	72
ANEXO 3 <i>Curriculum Vitae</i>	74

ABREVIATURAS

Hb	hemoglobina
OMS	Organização Mundial da Saúde
TIBC	capacidade total de ligação do ferro
ERO	espécies reativas de oxigênio
DNA	ácido desoxiribonucléico
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
O ₂ ^{•-}	radical superóxido
RO [•]	radical alcóxil
RO ₂ [•]	radical peróxil
OH [•]	radical hidroxila
CAT	catalase
SOD	superóxido dismutase
GPx	glutathione peroxidase
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
DTNB	ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico
GR	glutathione reductase
GSH	glutathione total
GSSG	glutathione oxidada
4-HNE	4-hidroxi-2-nonenal
HPLC	cromatografia líquida de alta performance
MDA	malondialdeído
Cu	cobre
Zn	zinco
Mn	manganês
Se	selênio
CHCM	concentração de hemoglobina corpuscular média
VCM	volume corpuscular médio
RDW	coeficiente de variação ao redor da média do volume dos eritrócitos

RESUMO

Título: Avaliação do estresse oxidativo em pacientes idosos com anemia ferropênica

A deficiência de ferro é o resultado de um longo período de balanço negativo do ferro, culminando na exaustão do estoque de ferro do organismo. Isto é revelado quando a concentração de hemoglobina declina para valores abaixo dos limites normais e então aparece a anemia, que ocorre devido à deficiente síntese de hemoglobina, com diminuição da proliferação eritrocitária. A anemia ferropênica é considerada o maior problema de saúde no idoso e está associada com várias complicações, incluindo doença cardiovascular, disfunção cognitiva, aumento no risco de morte, e principalmente tem um significativo efeito na qualidade de vida. Estudos revelam que a anemia por deficiência de ferro causa maior susceptibilidade aos agentes oxidantes. Utilizando técnica espectrofotométrica, foram determinadas as atividades das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) e quantificada a glutathione total (GSH) nos eritrócitos dos pacientes. Também determinou-se o dano oxidativo nas proteínas plasmáticas e no hemolisado celular pelo método do carbonil a 360 nm. Os níveis da peroxidação lipídica (MDA) e da vitamina C foram determinados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Os participantes da pesquisa foram selecionados de Ambulatórios de Atenção Básica de Saúde da Região Norte do Rio Grande do Sul, sendo que 17 indivíduos apresentaram anemia ferropênica e hipertensão primária e 18 apenas hipertensão primária devido à dificuldade de selecionar pacientes sem nenhuma patologia associada. Todos os indivíduos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados obtidos foram expressos como médias \pm desvio padrão e analisados utilizando-se o Teste t-Student. Os resultados do trabalho mostram que os indivíduos com anemia ferropênica apresentam atividade significativamente elevada da SOD e da CAT em relação aos indivíduos controle, mas não apresentaram diferença na atividade da GPx nem da GSH. Observamos também, dano oxidativo em proteínas plasmáticas, mas não no hemolisado celular. Os pacientes com anemia ferropênica mostraram dano oxidativo em proteínas plasmáticas significativamente maiores, assim como um aumento significativo da produção de MDA no soro, como um indicativo do aumento da auto-oxidação dos lipídios sob condições de estresse oxidativo. Os níveis séricos da vitamina C não mostraram diferença significativa entre os grupos. Estes dados revelam o envolvimento de espécies reativas de oxigênio no agravamento da anemia carencial. Sendo assim, reforça-se a necessidade de diagnosticar e tratar esses pacientes precocemente, diminuindo a magnitude dos efeitos da anemia na saúde do idoso.

Palavras chave: radicais livres, anemia ferropênica, dano oxidativo, carbonil, MDA.

ABSTRACT

Title: Oxidative stress evaluation in old patients with iron deficiency anaemia

Iron deficiency is the outcome of a long period of negative iron balance, culminating in exhaustion of the body's iron stores. This is revealed when hemoglobin concentration declines to values below normal levels and anaemia is detected, due to a deficient synthesis of hemoglobin, with decrease in erythrocyte proliferation. Iron deficiency anaemia is considered the most important health problem in elderly and it is associated with various complications, including cardiovascular disease, cognitive dysfunction, increased risk of death and, mostly, it has a meaningful effect in the quality of life. Studies reveal that iron deficiency anaemia cause higher susceptibility to oxidant agents. Using spectrophotometric techniques, the activities of antioxidant enzymes, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD) and total glutathione (GSH) were quantified in the erythrocytes of the patients. We also determined oxidative damage of plasma proteins and in hemolysate using the carbonyl assay at 360 nm. The levels of lipid peroxidation (MDA) and vitamin C were determined by high-performance liquid chromatography (HPLC). Participants in this study were selected in Ambulatories of Basic Health Attention in the North of the State of Rio Grande do Sul. 17 individuals presented iron deficiency anaemia and primary hypertension and 18 only primary hypertension, because it was difficult to select patients without any associated deficiency. All individuals signed the term of free and clarified consent to participate in this study. Data were analyzed using t-Student Test. Results show that individuals with iron deficiency anaemia show significantly higher activity of SOD and CAT when compared with those from the control group, but they do not show difference in the activity of GPx or GSH. Oxidative damage was also observed in plasma proteins, but not in the cellular hemolysate. Patients with iron deficiency anaemia showed oxidative damage in plasma proteins significantly higher when compared with the control group. And they also showed a significant increase in the production of MDA in the serum as an indicative of the increased auto-oxidation of lipids under oxidative stress. Serum vitamin C levels did not show significant difference between the groups. These data reveal the involvement of the reactive oxygen species in iron deficiency anaemia. Therefore, we reinforce the need to diagnose and treat these patients early to reduce the magnitude of the effects of anaemia on the health of the elderly.

Key words: free radicals, iron deficiency anaemia, oxidative damage, carbonyl, MDA.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Idoso no contexto social

O momento demográfico por que passa a população brasileira se caracteriza por baixas taxas de fecundidade, aumento da longevidade e urbanização acelerada. A interação destas transformações tem levado a um crescimento mais elevado da população idosa com relação aos demais grupos etários. A participação de indivíduos maiores de 65 anos dobrou nos últimos 50 anos; passou de 4% em 1940 para 8% em 1996. Projeções recentes mostram que este segmento poderá vir a ser responsável por quase 15% da população total no ano 2020 (CAMARANO, 1999).

Esse aumento relativamente mais elevado do contingente idoso é resultado de suas mais altas taxas de crescimento, em face da alta fecundidade prevalecente no passado, comparada à atual, e da redução da mortalidade. Este fenômeno é chamado de envelhecimento populacional, que se dá em virtude da diminuição do número de jovens do total da população brasileira. Enquanto o envelhecimento populacional significa mudanças na estrutura etária, a longevidade é um processo que se inicia no momento do nascimento e altera a vida do indivíduo, a estrutura familiar e, certamente, a sociedade. O aumento da longevidade deve ser reconhecido como uma conquista social, o que se deve em grande parte ao progresso da medicina e de uma cobertura mais ampla dos serviços de saúde. No entanto, esse novo cenário é visto com preocupação por

acarretar mudanças no perfil das demandas por políticas públicas, colocando desafios para o Estado, a sociedade e a família (CAMARANO et al, 1999).

Cada vez é maior o número de idosos no mundo inteiro, sendo que esse fenômeno de envelhecimento populacional ocorre de forma mais intensa nos países em desenvolvimento, como é o caso do Brasil, onde esse grupo é o que mais cresce (KALACHE et al, 1987).

A população de norte-americanos com 65 anos ou mais no ano de 2000, era de 35 milhões, representando 13% da população total. Já no Brasil, essa população representava 8,6%, ou seja, 14,5 milhões de indivíduos com idade superior a 65 anos (REBOUÇAS & PEREIRA, 2008), sendo que o último censo demográfico apontou 7,1% de idosos no Rio Grande do Sul (IBGE, 2001).

O processo de envelhecimento humano é um processo fisiológico, dinâmico, progressivo e irreversível, no qual ocorrem alterações morfológicas, metabólicas, comportamentais e psicossociais. Essas alterações acarretam perda progressiva da capacidade de adaptação ao meio ambiente, tornando o indivíduo mais vulnerável, o que leva ao aumento da incidência de processos patológicos nesse grupo de indivíduos. Observa-se que ainda podem prejudicar a ingestão e absorção de determinados nutrientes, ocasionando maior propensão ao desenvolvimento de processos anêmicos e deficiência de micronutrientes essenciais (GUIGOZ et al, 1996).

1.2 Anemia

A anemia é uma anomalia caracterizada pela diminuição do número de hemácias circulantes, da concentração de hemoglobina (principal proteína no transporte de oxigênio no sangue) e da porcentagem dos glóbulos vermelhos (hematócrito). Assim, sob aspectos fisiológicos, anemia, significa hipóxia, ou seja, a redução na capacidade de transporte e troca do O₂ molecular no sangue. Sua classificação está baseada no tamanho do eritrócito/hemácia – macrocítica (grande), normocítica (normal) e microcítica (pequena) - e conteúdo de hemoglobina - hipocrômica (coloração pálida) e normocrômica (coloração normal) (MAHAN & SCOTT-STUMP, 1998).

Estudos mostram que a grande maioria das anemias é causada por ausência de nutrientes essenciais para a síntese normal de eritrócitos na medula óssea, como o ferro, a vitamina B12 e o ácido fólico. Outras podem ser resultantes de uma variedade de condições, como hemorragia, doenças crônicas, deficiências genéticas, entre outros (MAHAN & SCOTT-STUMP, 1998; GABRILOVE, 2005).

Anemia é uma das mais comuns deficiências nutricionais no mundo hoje, sendo considerado um problema de saúde pública, com consequências importantes para a saúde humana, que atinge populações do mundo todo com diferenças significativas para os países menos desenvolvidos (WHO/UNICEF, 2004).

As manifestações clínicas da anemia em geral referem-se aos ajustes dos sistemas cardíacos e respiratórios à anemia: tolerância diminuída ao trabalho,

dispnéia e palpitações. O sinal clínico da anemia, geralmente percebido por familiares, é a palidez. A intolerância ao frio pode ocorrer pela redução do fluxo sanguíneo à pele. Alterações neuromusculares podem acontecer como: cefaléia, vertigem, zumbido, dificuldade de concentração, irritabilidade, insônia e fraqueza (EISENSTAEDT et al, 2006).

1.2.1 Anemia no idoso

Anemia é a maior síndrome geriátrica devido a sua relevância clínica e comum ocorrência na população idosa (CHAVES et al, 2002). Atualmente é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como nível de hemoglobina (Hb) menor que 13 g/dL em homens e menor que 12g/dL em mulheres (WHO, 1968).

A anemia tem um impacto negativo substancial sobre a função e a qualidade de vida no idoso (EISENSTAEDT et al, 2006). Níveis de hemoglobina declinam com a idade, no entanto a prevalência de anemia em idosos é alta e não pode ser encarada como uma decorrência natural do envelhecimento (DALY, 1989), sendo considerada como importante problema entre indivíduos idosos.

A maioria dos idosos mantém uma contagem normal de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, e em poucos são encontrados níveis de hemoglobina menor que 12 g/dL, por esta razão deve se considerar anemia na população idosa como um sinal de doença e merece investigação (SMITH, 2000).

A prevalência da anemia entre idosos varia consideravelmente, como mostra a Tabela 1. Variáveis como, sexo, raça, moradia e estado de saúde refletem a heterogeneidade desta população.

Tabela 1. Prevalência de Anemia em idosos

	Ano	Local	Atendimento	N	Prevalência (%)	Critério	Idade (anos)
Mattila	1986	Finlandia	Amb	347	3,7	WHO	≥ 65
Woo	1987	China	Amb	427	9,6	WHO	≥ 60
Timiras	1987	EUA	Amb	1024	12,01	< 14 e < 12	≥ 60
SENECA	1991	19 centros Europa	Amb	2600	5,5	WHO	70 - 75
Cangerana	1993	Brasil	Amb	2497	13,34	WHO	≥ 60
Izaks	1999	Países baixos	Amb	755	20	WHO	≥ 85
Nilsson- Ehle	2000	Suécia	Amb	360	28,3	WHO	≥ 88
Olivares	2000	Chile	Amb	274	4,7	WHO	≥ 60
Guralnik	2004	EUA	Amb	4199	10,6	WHO	≥ 65
NHANES III							
Joosten	1992	Bélgica	Hosp	114	46	WHO	≥ 65
Mitrache	2001	Suiça	Hosp	186	44	> 12	≥ 65
Sibai	2003	Libano	Inst	100	42,5	WHO	≥ 65

Resultados do III National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III) realizado nos Estados Unidos indicam que a prevalência de anemia foi de 11% em indivíduos com mais de 65 anos vivendo na comunidade, de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde. A prevalência de anemia é ainda maior em pacientes hospitalizados e institucionalizados (MARALDI et al, 2006). Um estudo com 900 idosos institucionalizados observou que 48% eram anêmicos de acordo com critérios da OMS (ARTZ et al, 2004).

A Tabela 2 mostra a prevalência de anemia segundo dados da Organização Mundial da Saúde e mostra que quase metade dos indivíduos com mais de 60 anos em países não industrializados, como o Brasil, são anêmicos.

Tabela 2. Estimativa do percentual de anemia no mundo (1990 – 1995) baseada na concentração de hemoglobina.

	Países industrializados (%)	Países não-industrializados (%)
Crianças (0 – 4 anos)	20,1	39
Crianças (5 -14 anos)	5,9	48,1
Gestantes	22,7	52,0
Mulheres (15 – 59 anos)	10,3	42,3
Homens (15 – 59 anos)	4,3	30,0
Idosos (+ de 60 anos)	12,0	45,2

Fonte: WHO, 2001

1.2.2 Causas de anemia no idoso

As causas de anemia no idoso são muitas e incluem anemia de doenças crônicas (30 – 45%), deficiência de ferro (15 – 30%), pós-hemorragica (5 – 10%), deficiência de vitamina B12 e folato (5 – 10%), leucemia linfocítica crônica (5 – 10%), síndrome mielodisplásica (5%) e anemia de causa desconhecida (15 – 25%) (SMITH, 2000; GABRILOVE, 2005).

A anemia de doença crônica é frequentemente encontrada em indivíduos idosos, principalmente em hospitalizados. É uma anemia hipoproliferativa, normocrômica e normalmente normocítica, associada com baixa contagem de

reticulócitos. É considerada leve a moderada, com níveis de hemoglobina superiores a 8 g/dL. No idoso, é importante distinguir entre anemia de doença crônica e anemia por deficiência de ferro. Assim, a dosagem de ferritina sérica é o teste mais utilizado para distinguir estas duas condições (GABRILOVE, 2005), como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Diferenciação laboratorial entre anemia de doença crônica e por deficiência de ferro.

Teste laboratorial	Valores normais	Deficiência de Ferro	Anemia de doença crônica
Ferro sérico (µg/dL)	60 – 100	< 60	< 60
TIBC* (µg/dL)	250 – 400	> 400	< 250
Saturação da transferrina (%)	20 – 60	< 16	< 20
Ferritina sérica (ng/mL)	100 - 300	< 100	> 100

*TIBC: capacidade total de ligação do ferro
Adaptado de GABRILOVE, 2005

Dados do III National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), mostraram que aproximadamente um terço da anemia parece estar relacionada à deficiência nutricional, com mais da metade dos casos com deficiência somente de ferro ou combinado com deficiência de folato ou vitamina B12 (GURALNIK et al, 2004), conforme mostra a Tabela 4.

Tabela 4. Distribuição de tipos de anemia em indivíduos com mais de 65 anos nos Estados Unidos: NHANES III, fase 2, 1991 a 1994

Anemia	N°	Tipo (%)	Total anemia (%)
Com deficiência nutricional			
Ferro	467 000	48.3	16.6
Folato	181 000	18.8	6.4
B12	166 000	17.2	5.9
Folato e B12	56 000	5.8	2.0
Ferro com folato ou B12 ou ambos	95 000	9.9	3.4
Total	965 000	100.0	34.3
Sem deficiência nutricional			
Insuficiência renal	230 000	12.4	8.2
Anemia de doença crônica	554 000	30.0	19.7
Insuficiência renal e anemia de doença crônica	120 000	6.5	4.3
Anemia inexplicada	945 000	51.1	33.6
Total	1 849 000	100.0	65.7
Total de anemia	2 814 000	NA*	100.0

* Não Aplicável

Adaptado de Guralnik et al, 2004.

Anemia tem várias conseqüências adversas no idoso. Está associada com aumento na mortalidade (ANIA et al, 1997; IZAKS, 1999), do número de hospitalizações, aumento na incidência e maior severidade da doença cardiovascular (EZEKOWITZ et al, 2003), prejuízo cognitivo e aumento de demência (LIPSCHITZ, 2003; DENNY et al, 2006), diminuição da capacidade

física (PENNINX et al, 2003), elevado risco para quedas e fraturas (HERNDON et al, 1997) e diminuição da qualidade de vida (LIND et al, 2002; LIPSCHITZ, 2003; THOMAS, 2004). Notavelmente, estes efeitos são observados não somente em indivíduos idosos com severa redução na hemoglobina, mas também naqueles idosos com anemia leve ou níveis de hemoglobina abaixo do normal (EISENSTAEDT et al, 2006).

1.3 Ferro e o seu metabolismo

O ferro é componente de todos os organismos vivos e neles participa primordialmente de reações de transferência de elétrons, pois tem a capacidade de facilmente recebê-los e doá-los, pela interconversão entre ferro no estado ferroso (Fe^{2+}) e ferro no estado férrico (Fe^{3+}). A maioria das proteínas que contêm ferro é semelhante do ponto de vista estrutural. Em parte delas, o ferro está incluído no grupo heme, o sítio ativo de transporte de elétrons de citocromos, citocromo oxigenase, peroxidases, catalase, mioglobina e hemoglobina. Por outro lado, em outras proteínas, ele pode ser encontrado na forma sulfúrea (Fe-S), como na ribonucleotídeo-redutase, aconitase e desidrogenase succínica. No entanto, o ferro pode lesar diferentes tecidos por catalisar a reação que converte peróxido de oxigênio (H_2O_2) em radicais livres, que lesionam a membrana celular, proteínas e DNA. Entretanto, nem bactérias nem células eucariotas são capazes de se proliferar na ausência de ferro (CALADO et al, 2004). O íon ferro é um elemento fundamental para a vida do ser humano, sendo essencial no

metabolismo energético celular e no transporte de oxigênio (EMERIT et al, 2001; ATANASIU et al 2007).

Em adultos normais, a quantidade total de ferro corpóreo é de aproximadamente 3,5 g a 4,0 g; a quantidade de ferro absorvida diariamente equivale à quantidade excretada (1 a 2 mg/dia), e 20 a 30 mg/dia de ferro do organismo são continuamente reciclados através de um eficiente sistema de reutilização desse metal. Destes, aproximadamente 65% estão sob a forma de hemoglobina, 4% a 10% estão sob a forma de mioglobina, 1% sob a forma dos vários compostos *heme* que promovem a oxidação intracelular, 0,1% estão ligados à proteína que transporta o ferro no plasma sanguíneo – transferrina e em torno de 15 a 30% estão armazenados no sistema reticuloendotelial e nas células do parênquima hepático, sob a forma de ferritina (DUNN et al, 2006).

O ferro proveniente da dieta é absorvido primeiramente pela mucosa duodenal combinando-se com a apotransferrina formando a transferrina, que é transportada no plasma. O excesso de ferro geralmente é armazenado nos hepatócitos e nas células do retículo endotelial presentes na medula óssea (figura 1). Uma vez no citoplasma o ferro liga-se à apoferritina formando a ferritina (TAPIERO et al, 2001).

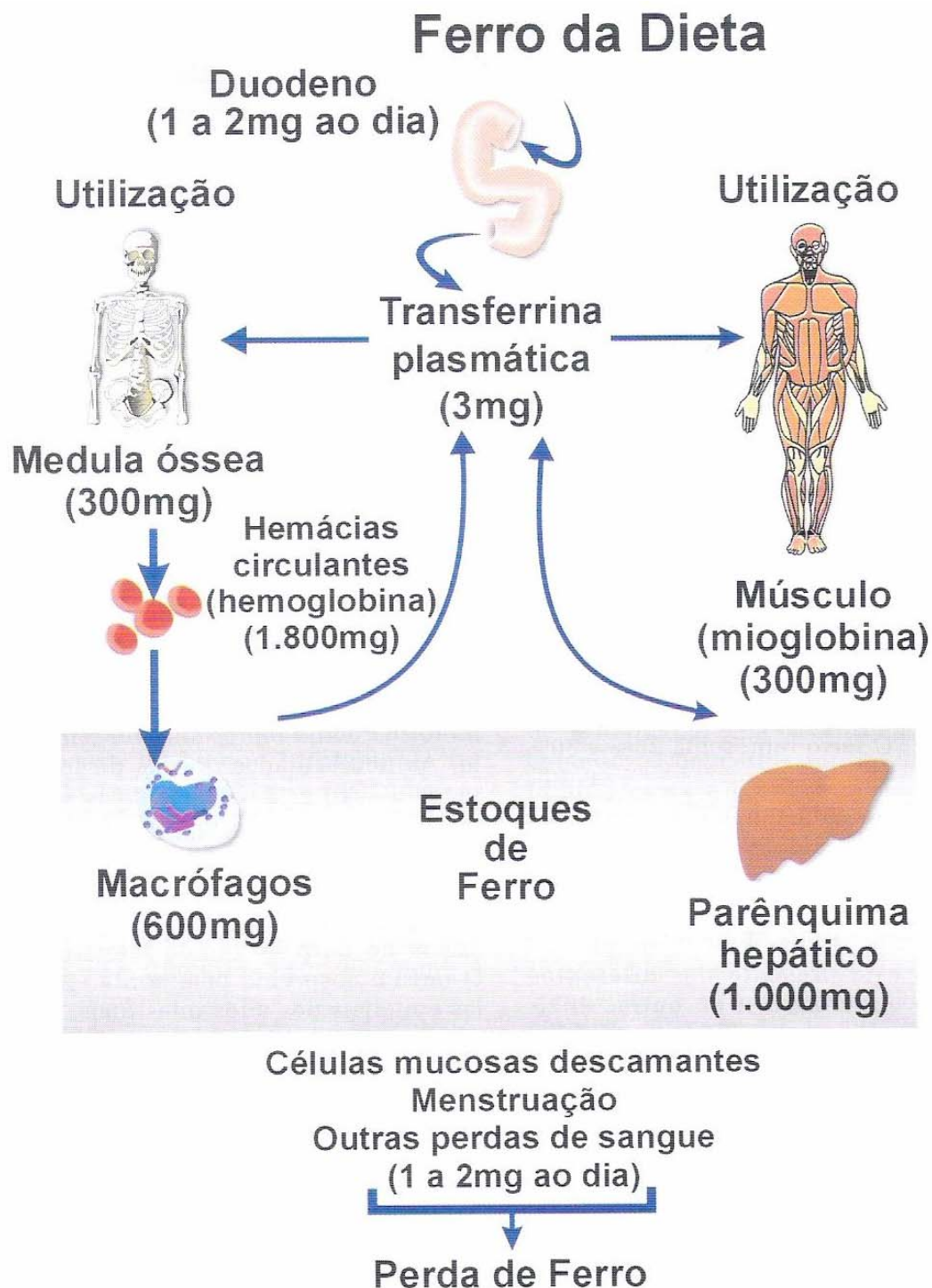


Figura 1. Distribuição do ferro no homem adulto. Em condições normais, 1 a 2 mg de ferro são absorvidos e perdidos pelo organismo diariamente. O ferro é absorvido pelos enterócitos dos vilos do duodeno e jejuno proximal e circula no plasma ligado à transferrina. A maioria é incorporada à hemoglobina. Cerca de 300mg estão presentes no músculo na forma de mioglobina e outros tecidos na forma de enzimas e citocromos. O ferro é estocado na forma de ferritina e hemossiderina em hepatócitos e sistema fagocítico mononuclear (reproduzido de CALADO et al, 2004)

A absorção do ferro vai depender, em larga escala, de seu equilíbrio no organismo. Comumente, cerca de 10% de ferro ingerido é absorvido. Esta quantidade pode ser aumentada nos estados de carência de ferro, quando o corpo pode captar cerca de 26% (TAPIERO et al, 2001).

Fisiologicamente, o organismo humano não é capaz de excretar o ferro, mesmo em condições de sobrecarga deste metal. Portanto, o aumento progressivo do aporte de ferro, seja por via intestinal seja por via parenteral, leva impreterivelmente à condição patológica de sobrecarga de ferro. Já a causa básica da diminuição dos estoques de ferro é o desequilíbrio entre quantidade absorvida e consumo e/ou perdas, que ocorrem por diversas vias, resultando no esgotamento das reservas de ferro do organismo. Isso pode ocorrer devido a diversos fatores, tais como: necessidade aumentada de ferro (crescimento, menstruação, gestação); diminuição da oferta ou da absorção do ferro (baixa quantidade e/ou biodisponibilidade do ferro da dieta, doenças inflamatórias crônicas intestinais, gastrectomia, entre outros); ou perda de ferro (sangramento patológico por alterações do trato gastrointestinal, parasitoses, doação de sangue, etc.) (NAIRZ & WEISS, 2006).

Para LEE e colaboradores (1998) a determinação do ferro sérico e a capacidade total de ligação do ferro (TIBC) são o ponto inicial do estudo do metabolismo do ferro. A TIBC é uma medida indireta da transferrina em termos de quantidade de ferro que ela irá ligar. Atualmente, existem testes que são utilizados diariamente para identificação desta concentração. Entre eles destacam-se os métodos colorimétricos e os automatizados.

1.3.1 Deficiência de Ferro

Dentre os nutrientes implicados na gênese da anemia, a deficiência de ferro é apontada como determinante causal principal da maioria dos casos, ocorrendo quando as reservas de ferro do organismo tornam-se insuficientes para manter a eritropoiese e por conseqüência a concentração sanguínea normal de hemoglobina. Entretanto, somente quando a concentração de hemoglobina cai abaixo do limite normal, que o paciente pode ser designado como tendo evoluído para o estado de anemia por deficiência de ferro (JOLOBE, 2000).

Segundo MAHAN & SCOTT-STUMP (1998) e PAIVA et al (2000), a carência de ferro ocorre em estágios graduais e progressivos até que a anemia se manifeste. O primeiro estágio é conhecido como *depleção* ou *balanço de ferro negativo* e é subdividido em estágio I, onde a absorção de ferro produz estoques moderadamente esgotados (níveis de ferro menor que 50 mg/dL), e estágio II, onde o balanço de ferro é caracterizado por estoques severamente esgotados. O segundo estágio, também chamado de *deficiência de ferro*, se caracteriza por uma eritropoese ferro-deficiente não acompanhada por anemia, mas com alterações bioquímicas que refletem a sua insuficiência para a produção normal de hemoglobina. O terceiro estágio (ou *anemia ferropênica* propriamente dita) é caracterizado pela diminuição dos níveis de hemoglobina, com prejuízos ao organismo tanto mais graves quanto maior for a redução da concentração de ferro disponível.

Os idosos constituem um grupo vulnerável e susceptível à anemia por deficiência de ferro, assim como outros grupos, tais como crianças e gestantes.

Suas prováveis causas são: (1) baixa ingestão de ferro devido a alimentação e condições bucais inadequadas, ingestão insuficiente de alimentos ricos em ferro ou de nutrientes favorecedores da absorção de ferro, ingestão de alimentos inibidores da absorção do mineral, situação econômica, social, cultural e psicológica desfavorável; (2) absorção inadequada devido à diarreia, doença intestinal, gastrite, interferências por drogas (antiácidos, antibióticos); (3) utilização inadequada do ferro devido aos distúrbios gastrointestinais crônicos; (4) perdas de sangue aumentada devido a hemorragias, úlceras, hemorróidas e parasitoses; (6) liberação deficiente ou utilização defeituosa de ferro do plasma a partir dos estoques de ferro devido a infecções crônicas (MAHAN & SCOTT-STUMP, 1998).

1.4 Estresse Oxidativo

A redução do oxigênio a água fornece a energia que permite a impressionante complexidade dos organismos superiores. Entretanto, este processo gera subprodutos altamente reativos, os quais podem ocasionar dano a proteínas, lipídios e ao DNA. Estes subprodutos são as espécies reativas de oxigênio (ERO). O termo ERO compreende radicais livres e outros compostos não radicalares (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Radicais livres são definidos como átomos ou moléculas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo (ELSBACH & WEISS, 1983). O termo ERO inclui não somente radicais de Oxigênio (como $O_2^{\bullet-}$,

radical superóxido; OH^\bullet , radical hidroxil; RO_2^\bullet , radical peroxil e RO^\bullet , radical alcoxil), mas também abrange derivados de O_2 que podem atuar como oxidantes ou redutores (H_2O_2 , peróxido de hidrogênio; HOCl , ácido hipocloroso, e O_3 , ozônio). As ERO são produzidas normalmente durante o metabolismo celular, onde estão envolvidas em reações de transferência de elétrons. Na respiração, a maior parte do oxigênio consumido é reduzido à água na mitocôndria, durante a passagem pela cadeia respiratória, possibilitando a síntese do ATP pela fosforilação oxidativa. No entanto, aproximadamente 5% do oxigênio sofre redução incompleta, produzindo o radical superóxido (O_2^\bullet). A partir deste, uma série de reações ocorre, gerando compostos como H_2O_2 e o radical hidroxila OH^\bullet , o mais reativo e danoso dos radicais formados (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Para proteger o organismo do ataque destas ERO existe uma série de sistemas de defesa antioxidante, como enzimas específicas que inativam algumas das ERO, como a catalase (CAT), glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), enzimas que controlam a disponibilidade de metais na célula, além de captadores não protéicos de radicais. Em paralelo, os organismos desenvolveram sistemas de regeneração e reparação de macromoléculas danificadas, especialmente o DNA, a fim de corrigir possíveis falhas ou sobrecargas nos mecanismos de defesa (THOMAS et al., 1998; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

Quando ocorre um aumento das ERO e/ou uma diminuição da capacidade antioxidante, as ERO são capazes de lesar componentes celulares direta ou indiretamente, modificando sua estrutura e/ou função e gerando o **estresse**

oxidativo (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Estudos têm demonstrado que espécies reativas de oxigênio participam da patofisiologia de várias doenças como Alzheimer, Parkinson, diabetes, esclerose múltipla, cirrose hepática e alguns tipos de câncer (MEHMET ASLAN et al, 2006; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007).

1.4.1 Oxidação em eritrócitos

Na maioria das células, as mitocôndrias são a principal fonte de ERO (JOHNSON et al, 2005). Nos eritrócitos, apesar de não apresentarem esta organela, ERO são continuamente produzidos devido à alta tensão de O_2 no sangue arterial e o seu abundante teor de ferro heme (CIMEN, 2008).

A fonte de ERO em eritrócitos é a proteína transportadora de oxigênio, a hemoglobina (Hb), que sofre autooxidação para produzir $O_2^{\bullet-}$. Já que a concentração intra-eritrocitária de Hb oxigenada é de 5 mM, mesmo uma pequena taxa de autooxidação pode produzir níveis substanciais de ERO. Redução ocasional de O_2 para $O_2^{\bullet-}$ é acompanhada por oxidação da Hb para metHgb, uma proteína de cor marron-ferrugem que não liga ou transporta O_2 (JOHNSON et al, 2005). Assim, é de especial interesse determinar a extensão desta via oxidativa e o equilíbrio das ERO nos eritrócitos (CIMEN, 2008).

Como consequência do seu papel fisiológico, as hemácias estão continuamente expostas ao estresse oxidativo. Organismos aeróbicos complexos asseguram um fluxo contínuo e adequado de oxigênio para os seus tecidos e,

simultaneamente, protegem-se da toxicidade inerente do oxigênio. Isso ocorre por dois mecanismos: proteínas transportadoras de oxigênio, ou seja, hemoglobina, e de sistemas de defesa antioxidante (CIMEN, 2008).

Ácidos graxos poliinsaturados dentro da membrana, um ambiente rico em oxigênio, e Hb rica em ferro tornam os eritrócitos susceptíveis à peroxidação lipídica (CLASTER et al, 1984). ERO iniciam reações de lipoperoxidação lipídica que levam à perda da integridade da membrana e morte celular. Malondialdeído (MDA), uma molécula bifuncional altamente reativa, é um produto final da peroxidação lipídica (CIMEN, 2008).

Proteinases ligadas à membrana são mecanismos de defesa antioxidantes secundários que protegem os eritrócitos, por preferencialmente degradarem proteínas danificadas oxidativamente (DUMASWALA et al, 1999).

Embora muitos componentes de membrana sejam possíveis alvos para oxidantes, cálcio ATPase pode ser de importância crucial para a sobrevivência dos eritrócitos. Ca-ATPase contém um ou mais grupos sulfidrilas que são susceptíveis à oxidação, com conseqüente perda da atividade enzimática. Porque esta enzima é fundamental para a manutenção de várias vias de sinalização extracelular e intracelulares de cálcio, a perda da sua atividade está associada à diminuição da deformabilidade eritrocitária e apoptose (SHALEV et al, 1981).

1.4.2 Defesas antioxidantes nos eritrócitos

Os eritrócitos humanos, devido ao seu papel como transportadores de O_2 e CO_2 , estão constantemente expostos ao estresse oxidativo e às espécies reativas de oxigênio. Porém, possuem um eficiente sistema antioxidante que consiste de defesas enzimáticas e não-enzimáticas (CIMEN, 2008).

O sistema enzimático é o primeiro a agir, evitando o acúmulo do ânion superóxido e do peróxido de hidrogênio. O sistema enzimático é formado por diversas enzimas, destacando-se a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT) e a glutaciona peroxidase (GPx).

O radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) sofre ação enzimática da superóxido dismutase (SOD) dismutando-a em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que possui reatividade limitada (NAOUM, 1996). Outro antioxidante enzimático é a catalase, a qual possui a capacidade de transformar o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O peróxido de hidrogênio também pode ser detoxificado pela glutaciona peroxidase, cuja ação ocorre através da redução do peróxido de hidrogênio e de hidroperóxidos orgânicos através da utilização da glutaciona (GSH), o qual é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico, cisteína e glicina que atua como co-substrato da glutaciona peroxidase. A manutenção dos níveis elevados da glutaciona peroxidase (GPx) é essencial para proteger e manter no estado reduzido os grupos constituídos por compostos organosulfurados (grupo thiol) das enzimas celulares, bem como das proteínas intermembrana e do citoesqueleto. Além disso, a atividade de GPx é dependente da glutaciona reduzida. A enzima glutaciona redutase (GR) dependente de NADPH reconverte continuamente a

glutathione oxidada (GSSG) para o estado reduzido. Cabe destacar que a glutathione reduzida além de ser um substrato para a GPx, também é o principal composto antioxidante intracelular (DAILLY et al., 1998).

Os antioxidantes não enzimáticos podem ser divididos em antioxidantes hidrofílicos (glutathione, vitamina C) e lipofílicos (vitamina A, vitamina E). A vitamina C (ácido ascórbico) destaca-se entre os mais eficientes mecanismos biológicos com capacidade redutora, atuando como “scavengers” e também regeneradora da vitamina E (tocoferol). Como é hidrossolúvel possui ação maior no plasma sanguíneo, enquanto que a vitamina E tem ação maior em membranas celulares, por ser lipossolúvel. O tocoferol (vitamina E) é um dos mais importantes antioxidantes localizados na membrana eritrocitária, com a função de interromper o processo oxidativo e evitar a propagação da geração de radicais livres (DAILLY et al., 1998).

As defesas antioxidantes dos eritrócitos estão, portanto, relacionadas com o potencial oxidativo que atinge a célula e, normalmente, suas ações consistem em neutralizar a geração de radicais livres e restaurar as lesões de causa química (NAOUM, 1996; HALLWELL & GUTTERIDGE, 2007).

A figura 2 mostra a ação das defesas antioxidantes no processo oxidativo dos eritrócitos.

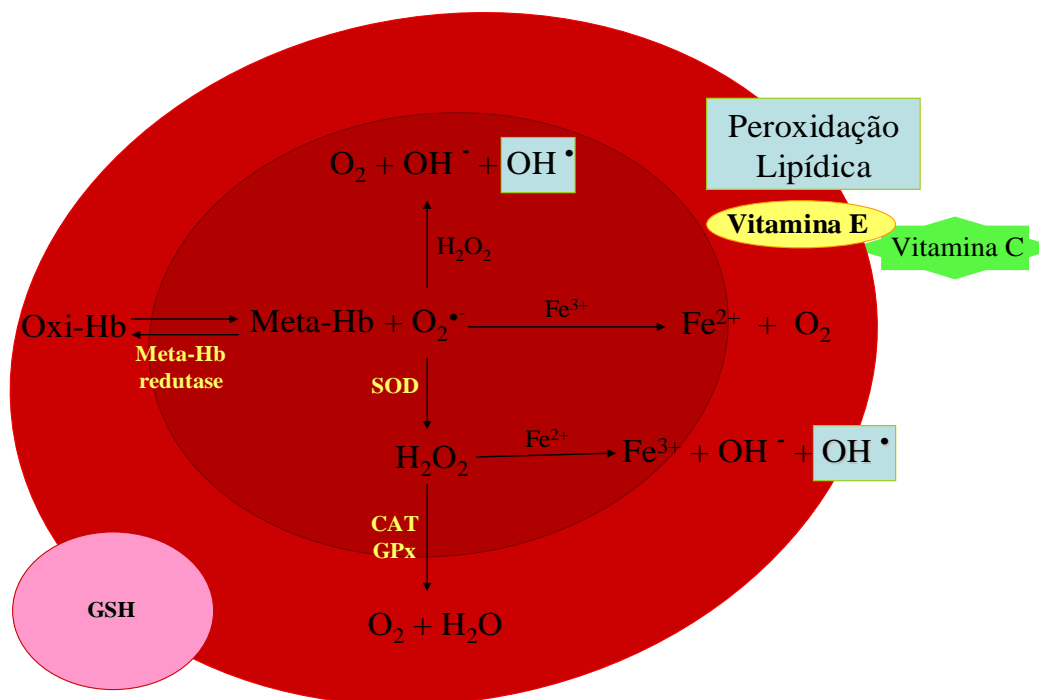


Figura 2. Processo oxidativo nos eritrócitos e suas principais defesas antioxidantes.

1.4.3 Estresse oxidativo na Anemia Ferropênica

A deficiência de ferro na anemia impede a síntese de hemoglobina e a formação de eritrócito com adequado conteúdo de hemoglobina. Além disso, afeta a produção de outras proteínas que contêm Fe^{+2} , tais como citocromo, mioglobina, catalase e peroxidase (MEHMET ASLAN et al, 2006).

Estudos têm reportado que os eritrócitos deficientes em ferro têm aumentada rigidez da membrana, aumentada susceptibilidade à hemólise por inibidores de grupamentos sulfidríla da membrana e também maior susceptibilidade a hemólise por peróxido de hidrogênio (RODVLEN et al, 1974; CARD & WEINTRAUB, 1971).

Também já foi mostrado que pacientes com anemia ferropênica apresentam distúrbio no sistema antioxidante, redução na imunidade celular e na atividade da mieloperoxidase (ISLER et al, 2002; GADJEVA et al, 2005). Tudo isso pode contribuir para a inadequada sobrevivência do eritrócito (GADJEVA et al, 2005).

Estas observações sugerem que o estresse oxidativo pode contribuir para a patogênese da anemia ferropênica, no entanto o mecanismo pelo qual o dano oxidativo acontece permanece desconhecido e a literatura oferece dados limitados e contraditórios sobre estresse oxidativo e defesas antioxidantes em pacientes com anemia ferropênica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o estresse oxidativo nos pacientes idosos com anemia por deficiência de ferro.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar indivíduos hipertensos e com anemia por deficiência de ferro;
- Medir a atividade das enzimas antioxidantes catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD) nos eritrócitos;
- Quantificar a glutathione total (GSH);
- Quantificar o dano oxidativo em proteínas citosólicas no plasma e nos eritrócitos dos indivíduos;
- Determinar o dano oxidativo em lipídios;
- Determinar os níveis de vitamina C no soro;
- Determinar a capacidade antioxidante total;
- Determinar os níveis de ferro total no plasma;
- Determinar os níveis séricos da ferritina.

3. MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS (ARTIGO)

3.1 Artigo Científico

Artigo aceito para publicação
Journal of Nutrition Health and Aging

Oxidative Stress in Older Patients with Iron Deficiency Anaemia

Aline Coghetto Baccin;^{1,2} Luísa Lauerman Lazzaretti;¹ Vanessa Duarte Martins Brandão;^{1,2} Vanusa Manfredini^{1,2}; Maria C. R. Peralba³ and Mara Silveira Benfato^{1,2}

¹ Laboratório de Estresse Oxidativo, Departamento de Biofísica (IB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul; ³ Departamento de Química Inorgânica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address correspondence to: Dr. Mara Silveira Benfato, Departamento de Biofísica (IB), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500 prédio 43431, Porto Alegre, RS, Brazil, 91501-970 - Tel: (55-51) 33087603 Fax: (55-51) 33087003 E-mail mara.benfato@ufrgs.br

Abstract

We propose that oxidative damage may play a role in the pathogenesis of iron deficiency anaemia (IDA). Participants were selected from Basic Attention Ambulatory from North of Rio Grande do Sul, Brazil. All subjects were older than 65 years – 17 patients with IDA and primary hypertension and 18 patients with primary hypertension (control group) were included in the present study. We measured antioxidant defenses including superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and total glutathione (GSH) by spectrophotometric assays. We also determined protein oxidative damage in haemolysate and plasma by carbonyl assay. We characterized the lipid peroxidation by malondialdehyde (MDA) accumulation.

The results show that IDA patients had significantly higher CAT and SOD levels than controls. GPx activity was not different between the groups. Oxidative protein damage was noted in the plasma but not in the haemolysate. A significantly enhanced production of MDA was observed in the serum of IDA patients, as an indication of increased level of auto-oxidizable lipids under oxidative stress. These results support the idea that patients with IDA are subjected to chronic oxidative stress. Therefore it is important that IDA in older persons receives adequate attention in clinical practice and is not considered simply a part of normal aging.

Keywords: antioxidant systems, oxidative damage, iron deficiency anaemia.

Introduction

At the molecular level, reactive oxygen species (ROS) such as $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , OH^{\cdot} are constantly generated in all aerobic organisms in response to both external and internal stimulus. Low concentration of radicals may be beneficial or even indispensable in processes such as intracellular messaging and defense against microorganisms, contributing to phagocytic bactericidal activity. In contrast, high doses and/or inadequate removal of active oxygen results in oxidative stress, this may cause severe metabolic malfunctions [1]. Oxidative stress is a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance in favor of the former and can lead to damage at the macromolecular level including DNA strand breakage, damage to membrane ion transport systems, enzymes and other proteins and lipid peroxidation. The oxidative stress and injuries are considered to be a component of virtually every disease process [2].

Anaemia has been defined as a pathological reduction of the current haemoglobin (Hb) concentration, triggered by various physiopathological mechanisms [3]. It is the most common haematological abnormality in the older population, showing large prevalence variation, between 2.9% to 61% in men, and 3.3% to 41.0% in women. Thus, it merits investigation and treatment [4,5].

Iron deficiency is the outcome of a long period of negative iron balance, culminating in exhaustion of the body's iron stores. However, it is only when the haemoglobin concentration falls below the lower limit of the normal range (that is < 12 g/dL and < 13 g/dL in elderly females and males, respectively), that the patient can be fully designated as having progressed to the status of iron deficiency anaemia [6,7]. The lack of iron prevents haemoglobin synthesis and the formation of erythrocytes with adequate haemoglobin content. Thus, it is generally accepted that iron deficiency-induced anaemia results at least in part from reduced erythropoiesis. The decrease of oxygen transport capacity in blood decreases the supply of oxygen to the tissues and thus leads to severe disablement. Some evidence, however, indicates that anaemia of iron deficiency is not only the result of decreased erythropoiesis but also due to decreased life span of iron-deficient erythrocytes [8].

Iron deficiency anaemia is linked to an increase in morbidity and mortality, and serves as an independent variable associated with poor outcomes. In the elderly population, anaemia is a risk factor for cardiovascular health and early death, contributes to fatigue, and negatively impacts on cognitive function, physical function, and the quality of life and serves as a marker of increased vulnerability. Iron deficiency does not only affect the production of haemoglobin, but also the production of other proteins containing Fe^{2+} , such as cytochromes, myoglobin, catalase, and peroxidase. The extracellularly generated $\text{O}_2^{\cdot-}$ and H_2O_2 have been shown to traverse erythrocyte membranes. Impairment of antioxidant defense system and reduced cellular immunity and myeloperoxidase activity were previously reported in patients with iron deficiency anaemia [9]. All of these may contribute to inadequate erythrocyte survival.

Erythrocytes are excellently equipped to handle intracellular oxidative stress through the combined activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione (GSH). However, the protective efficiency of erythrocytes against lipid peroxidation and carbonylation would depend on the balance between oxidant species and the availability of antioxidant defenses [1]. The literature offers contradictory and limited data on oxidative stress and antioxidant defenses in patients with iron deficiency anaemia [10]. The main objective of this study was evaluated blood antioxidant parameters in older patients with iron deficiency anaemia (IDA).

Materials and Methods

Materials

All reagents were purchased from Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA), unless otherwise stated.

Subjects

Approval for utilizing human specimens was obtained from the Ethics Commission of the Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI Campus de Erechim. Informed consent was obtained from all patients and the controls. All the subjects older than 65 years – 17 older patients with IDA and primary hypertension (IDA patients) and 18 older patients who had only primary hypertension (Controls) were included in the present study. Even knowing that hypertension causes oxidative stress, we selected for both groups patients with hypertension because it was difficult to find individuals with age over 65 without any pathology. Older controls and older subjects with iron deficiency anaemia were selected from Basic Attention Ambulatory from North of Rio Grande do Sul.

Anaemia was defined by the WHO criteria as a haemoglobin concentration of less 13 g/dL in men and less than 12 g/dL in women. Exclusion criteria included existence of diabetes mellitus, cancer, coronary artery disease, rheumatoid arthritis, malignancy, alcohol use, renal dysfunction, Parkinson disease, Alzheimer's disease and smoking habit.

Red Blood Cell Separation

Blood was collected by vein puncture using an EDTA and acid-citrate-dextrose vacutainer. Plasma, platelets and the buffy coat were removed by consecutive centrifugations and washing in cold NaCl (0.9% w/v). The resulting red blood cells (RBC) were suspended in PBS (50 mM NaCl, 0.1M

$\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7.4). Haemolysates were obtained by lysing RBCs with ethanol 2% (ratio 1:10) followed by centrifugation to obtain crude extracts.

Haemolysates were used for enzymatic activities and protein carbonyl groups determination. Plasma was used for protein carbonyl groups determination and serum was used for total iron, ferritin and MDA determination.

Blood cell counts were measured with an automated analyzer (ABX Micros 60[®], ABX Diagnostics Ltda). Serum iron and ferritin levels were measured with an immunoturbidimetric assay (RA-XT[®], Bayer S.A).

Enzyme Activities

For measurement of the catalase activity hydrogen peroxide was used as a substrate and the decrease in H_2O_2 concentration was followed spectrophotometrically at 240 nm. One unit of CAT activity was defined as the amount of enzyme that degrades $1\mu\text{M}$ H_2O_2 per min. Results were presented as units per mg haemoglobin (U/g Hb) [11].

Glutathione peroxidase activity was quantified in 200 μl of each sample, with continuous photometric monitoring of oxidized glutathione (GSSG) at 37°C. The conversion of NADPH to NADP^+ was evaluated by UV absorbance at 340 nm. One unit of GPx activity was defined as the amount of enzyme that convert $1\mu\text{M}$ NADPH per min [12].

SOD activity was determined using the RANSOD kit (Randox, United Kingdom). The method is based on the formation of red formazan from the reaction of 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride and superoxide radical (produced in incubation medium from the xanthine–xanthine oxidase reaction system), which is assayed spectrophotometrically at 505 nm. The inhibition of the produced chromogen is proportional to the activity of the SOD present in the sample. A 50% inhibition is defined as one unit of SOD and the specific activity is represented as U/g Hb.

Carbonyl Assay

Carbonyl content was measured by the method described by Levine et al [13]. Triplicate aliquots of plasma protein (0.2 mL) or haemolysates (0.2 mL) were added with 0.2 mL of 10% trichloroacetic acid. The samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and 1 mL of either 2M HCl or 10 mM 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2M HCl were added to the precipitates and incubated at 37°C for 90 min. After the samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and the dinitrophenylhydrazine, excess was removed with ethanol-ethyl acetate 1:1 (v/v). The samples were centrifuged (8,000g, 10 min) and the protein was then dissolved by addition of 6M of guanidine hydrochloride. Quantification was performed using a spectrophotometer at an absorbance of 370 nm. The carbonyl content was calculated using a millimolar absorption coefficient of the hydrazone ($21,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

MDA Determination

MDA was measured by HPLC by the method described by Karatepe (2004) [14]. 25 mL of 0.1M perchloric acid and 55 mL of distilled water were added to a 20 mL aliquot portion of human serum. Addition of acid was necessary to precipitate proteins and release the malondialdehyde bound to the amino groups of proteins and other amino compounds. The samples then were centrifuged at 4500 rpm for 5 min and used for HPLC analysis. The mobile phase was 82.5:17.5 (v/v) 30 mM monobasic potassium phosphate (pH 3.6)-methanol, the flow rate was 1.2 mL/min and the chromatograms were monitored at 250 nm .

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed using SPSS software (version 16.0 for Windows). Results are expressed as means \pm SD, and they were analyzed by Student's t-test. The MDA results were transformed using log. Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

Results

Clinical characteristics of controls and IDA patients are shown in Table 1.

Table 1. Clinical characteristics of controls and IDA patients.

Characteristic	Controls (n=18)	IDA patients (n=17)
Age (years)	76 ± 6	75 ± 7
Erythrocytes (million/mm ³)	4.49±0.30	3.80±0.41*
Haemoglobin (g/dL)	13.44±1.00	10.41±0.9*
Hematocrit (%)	40.63±2.66	33.14±2.90*
Total iron (mg/L)	89.17±10.58	45.82±11.10*
Ferritin (ng/mL)	223.17±101.17	37.88±17.13*

*values below the normal physiologic levels.

Values are expressed as mean ± SD.

Erythrocytes from IDA subjects presented significant increase in CAT and SOD activities (Table 2). On the other hand, GPx activity in erythrocytes was similar in both study groups (Table 2).

Table 2. Antioxidant enzymes in red blood cells (RBC) of controls and IDA patients.

Groups	Controls (n=18)	IDA patients (n=17)
Catalase (U/gHb)	15,923.27±4,059.82	23,253.00±8,539.76*
Superoxide Dismutase (U/gHb)	709.27±149.24	1,148.87±433.08*
Glutathione Peroxidase (U/gHb)	111.12±42.96	135.37±53.43

Values are expressed as mean ± SD; * P≤0.05.

The carbonyl content of haemolysates and plasma proteins from RBCs is shown in Table 3. The level of protein oxidation is significantly higher in IDA patients than controls in plasma but not in haemolysates.

Table 3. Protein and lipid damage in controls and IDA patients.

Groups	Controls (n=18)	IDA patients (n=17)
Carbonyl in haemolysate (nmol / g Hb)	0.87±0.40	1.14±0.68
Carbonyl in plasma (nmol / g Hb)	1.58±0.36	2.27±0.74*
Malondialdehyde (log μ M)	2.34±0.14	2.58±0.11*

Values are expressed as mean \pm SD; * $P \leq 0.05$.

The lipid peroxidation index, determined on the basis of MDA levels, was higher in IDA patients than in controls (Table 3).

Discussion

The generation of reactive oxygen species (ROS) is a steady-state cellular event in respiring cells [15]. Their production can be grossly amplified in response to a variety of pathophysiological conditions such as inflammation, immunologic disorders, hypoxia, hyperoxia, metabolism of drugs or alcohol, exposure to UV or therapeutic radiation, and deficiency in antioxidant enzymes. Uncontrolled production of ROS often leads to damage of cellular macromolecules (DNA, protein, and lipids). A number of major cellular defense mechanisms exist to neutralize and combat the damaging effects of these reactive substances. The enzymatic system functions by direct or sequential removal of ROS (catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase), thereby terminating their activities [16]. Oxidative stress, which is defined as an imbalance between the total antioxidant defenses and the reactive species formed in the tissues is an important event that has been related to the pathogenesis of many diseases. Oxidant stress has been shown to play an important role in the pathogenesis of iron deficiency anaemia (IDA) [17, 18]. It was shown that the iron deficiency anaemia red cells have increased membrane rigidity, decreased deformability, and increased susceptibility to haemolysis by inhibitors of membrane sulfhydryl groups. Moreover oxidative insult may result in immune recognition and eventual removal of red blood cells from the circulation [19].

As expected, the elderly with iron deficiency anaemia showed erythrocytes, haemoglobin, haematocrit, iron and ferritin values below the normal physiologic levels, besides this anaemia showed mild-to-moderate form, with normocytic and normochromic erythrocytes. However this pathology deserves more attention, because the harmful effects are not only observed in older people with severe haemoglobin reduction, but also observed in patients with mild anaemia or haemoglobin levels below normal [20].

In this study we found an elevated SOD activity in IDA patients when compared to controls. This elevated red cell SOD could be a compensatory response to increased oxidative stress. A possible basis for increased oxidative

stress to the red cell could be an abnormal accumulation of superoxide anion. SOD enzymatically converts $O_2^{\cdot-}$ to H_2O_2 and thereby impairs its spontaneous conversion to singlet oxygen. However, singlet oxygen and the hydroxyl radical are thought to be more damaging than H_2O_2 and would accumulate to a lesser degree with an elevation in SOD activity [1].

The potential benefit of higher SOD activity in red cell from iron deficient individuals might not be obvious at first glance since H_2O_2 , the product of the reaction, can result in oxidative damage. A second beneficial consequence is that a lower $O_2^{\cdot-}$ radical level may decrease the conversion of ferric to ferrous iron. Ferrous iron and H_2O_2 result in the generation of the hydroxyl radical, a key intermediate in many of the pathways that propagate additional free radicals. Therefore a higher SOD activity in the iron-deficient red cell is likely to constrain oxidative damage [10].

Even though CAT is not essential for some cell types under normal conditions, it plays an important role in the acquisition of tolerance to oxidative stress in the adaptive response of cells. This suggests the pivotal role of catalase for cell adaptation to oxidative stress [1]. Catalase regulates intracellular ROS levels by converting H_2O_2 to H_2O and O_2 [21]. However, the mechanisms responsible for the regulation of catalase are largely unknown, particularly the effects of post-translational modifications [22]. In the present study, CAT activity was significantly higher in patients with IDA compared to the control group.

Cellerino et al [23] observed decreased GPx activity in patients with IDA, and suggested that iron could be of crucial importance for erythrocytes GPx activity. However, Isler and co-workers [24] showed that GPx activity in anaemia was similar to that of normal cells. Authors speculated that iron is not the only cause of changes in GPx and SOD activities in patients with IDA. Other minerals, such as Cu, Zn, Mn, and Se, which mediate the activities of these enzymes, may also play important roles in the alteration of enzyme activities. It has been reported that the activities of pentose phosphate pathway enzymes, the major source of the NADPH production were increased in patients with IDA. Since GPx activity depends on NADPH levels produced by pentose phosphate pathway, this may explain why the GPx activity was within the normal level in patients with IDA. We

also found similar GPx activities in the anaemic and control groups. GPx activity in our study was in accordance explained above.

Protein carbonyl groups are formed by oxidation of the side chains of lysine, proline, arginine, and threonine residues. In addition to the direct oxidation of protein side chains, carbonyl groups can be introduced into proteins by Michael addition reactions of 4HNE, a product of lipid peroxidation [13]. The level of protein carbonyl groups, a measurement of the oxidative damage, was higher in plasma proteins but not in haemolysates of IDA subjects. To our knowledge this is the first work measuring carbonyl in IDA.

Alterations of protein structure by oxidants, with include modifications of amino acid side chain, covalent cross-linking, and non-enzymatic cleavage, may result in a partial or complete loss of protein functionality [25].

Among plasma proteins, blood fibrinogen undergoes free radical oxidation and is the most oxidizable plasma protein [26]. Fibrinogen is a plasma globular glycoprotein involved in cascade reactions of blood coagulation. Fibrinogen stimulates migration and proliferation of smooth muscle cells, promotes platelet aggregation, increased blood viscosity, and exhibits mitogenic and angiogenic activity [27]. Tekin et al [18], in a study with childhood IDA have shown that the maximum aggregation intensity of platelets induced by both adenosine diphosphate (ADP) and collagen and the maximum aggregation rate of platelets induced by ADP are increased in IDA.

RBC are particularly susceptible to peroxidative damage because they contain haemoglobin, one of the most powerful catalysts for initiation of peroxidative reaction [28]. RBC were incubated with H_2O_2 concentrations (0.5-10 mM) in buffer. Separate analysis of extracellular and intracellular MDA showed that 80-90% of this compound was localized outside RBC, also in H_2O_2 concentrations where hemolysis was not verified [29]. Such data indicate that the MDA produced by lipid peroxidation of plasmatic membrane can be externalized. Oxidative damage has been shown to change a number of RBC membrane properties. For example, Hebbel and Miller [30] treated RBCs with malondialdehyde (MDA), a by-product of lipid peroxidation, and demonstrated that such cells were recognized and ingested by macrophages. In addition, oxidative

damage to haemoglobin can induce band 3 clustering, which in turn leads to increased autologous immunoglobulin G (IgG) binding to the RBC [30]. Moreover, has found that lipid peroxidation can cause externalization of phosphatidylserine (PS) in red cell membranes, and this PS exposure on the outer surface of RBC membrane is associated with enhanced phagocytosis of RBC by monocytes. Abnormal exposure of PS on the cell surface cannot only mediate the binding to macrophages but may allow adhesion of erythrocytes to endothelial cells. This adhesion may prevent the microcirculation and it is tempting to speculate that it participates in the generation of ischemic complications of iron deficiency. It can also contribute to the accelerated clearance of erythrocytes from circulating blood, decreasing life span of iron-deficient erythrocytes [8].

Our results suggest that there is an increased oxidative stress represented by the increasing in MDA and carbonyl groups, even in the presence of increased production of antioxidant enzymes. Increased oxidative stress may be due to increased concentration of free protoporphyrin present in IDA that has higher ability to auto-oxidize than normal haemoglobin [32].

Elderly subjects presented with light anaemia, but they showed oxidative damage anyway; therefore it is important that IDA in older persons receives adequate attention in clinical practice and is not considered simply a normal part of aging.

References

1. Gadjeva V, Kuchukova D, Georgieva R. Vitamin combinations reduce oxidative stress and improve antioxidant status in patients with iron deficiency anaemia. *Comp Clin Path.* 2005; 14: 99-104.
2. Cimen MYB. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 2008; 390: 1-11.
3. World Health Organization. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva: WHO 2001; 114p.
4. Mukhopadhyay D, Mohanaruban K. Iron deficiency anaemia in older people: investigation, management and treatment. *Age Ageing.* 2002; 31: 87-91.
5. Barbosa DL, Arruda IKG, Diniz AS. Prevalência e caracterização da anaemia em idosos do Programa de Saúde da Família. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2006; 28(4): 288-292.
6. Izaks GJ, Westendorp RGJ, Knook DL. The definition of anaemia in older persons. *JAMA.* 1999; 281: 1714-1717.
7. Jolobe OMP. Medicine in the elderly: Does this elderly patient have iron deficiency anaemia, and what is the underlying cause? *Posgrad Med J.* 2000; 76: 195-198.
8. Kempe DS, Lang PA, Durantou C et al, Enhanced programmed cell death of iron-deficient erythrocytes. *FASEB J.* 2006; 20: 368-370.
9. Gabilove J. Anaemia and the elderly: clinical considerations. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* 2005; 18: 417-422.

10. Jansson LT, Perkkio MV, Willis WT et al. Red cell superoxide dismutase is increased in iron deficiency anaemia. *Acta Haematol.* 1985; 74: 218-221.
11. Taniguchi N, Gutteridge JMC. *Experimental Protocols for Reactive Oxygen and Nitrogen Species.* 1st Ed, New York: Oxford University Press; 2000.
12. Pinto RE, Bartley W. Effect of age and sex on Glutathione reductase and Glutathione peroxidase activities and on aerobic Glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J.* 1969;112: 109-115.
13. Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Alm B, Shaltie IS, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1990; 186: 464-478.
14. Karatepe M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North Americ.* 2004; 22: 362-365.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine,* 3rd Ed, New York: Oxford University Press; 2007.
16. Gaetani GF, Ferraris AM, Rolfo M, et al. Predominant role of catalase in the disposal of hydrogen-peroxide within human erythrocytes. *Blood.* 1996;47:1595-1599.
17. Vives Corrons JL, Miguel-Garcia A, Pujades MA et al. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to in vitro oxidative stress. *Eur J Haematol.* 1995; 55: 327-331.
18. Tekin D, Yavuzer S, Tekin M et al. Possible effects of antioxidant status on increased platelet aggregation in childhood iron-deficiency anaemia. *Pediatr Int.* 2001; 43: 74-77.

19. Card R, Weintraub L. Metabolic Abnormalities of erythrocytes in severe iron deficiency. *Blood*. 1971; 37: 725-732.
20. Eisenstaedt R, Penninx BWJH, Woodman RC. Anaemia in the elderly: Current understanding and emerging concepts. *Blood Rev*. 2006; 20:213-226.
21. Amstad P, Peskin A, Shah G, et al. The balance between Cu,Zn-superoxide dismutase and catalase affects the sensitivity of mouse epidermal cells to oxidative stress. *Biochemistry*. 1991;30: 9305-9313.
22. Cao C, Leng Y, Liu X, et al. Catalase is regulated by ubiquitination and proteosomal degradation. Role of the c-Abl and Arg tyrosine Kinases. *Biochemistry*. 2003;42:10348-10353.
23. Cellerino R, Guidi G, Perona G. Plasma iron and erythrocytic glutathione peroxidase activity. A possible mechanism for oxidative haemolysis in iron deficiency anaemia. *Scand J. Haematol*. 1976; 17: 111-116.
24. Isler M, Delibas N, Guclu M, et al. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anaemia: effects of different treatment modalities. *Clin Sci*. 2002; 43(1): 16-19.
25. Saha A, Adak S, Chowdhury S, et al. Enhanced oxygen releasing capacity and oxidative stress in diabetes mellitus and diabetes mellitus-associated cardiovascular disease: A comparative study. *Clin Chim Acta*. 2005;361:141-149.
26. Shacter E, Willians JA, Lim M, et al. Different susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radic Biol Med*. 1994;17:429-437.

27. Aseichev AV, Azizova OA. Mechanism of activation of ADP-induced platelet aggregation under the influence of oxidatively modified fibrinogen. *B Exp Biol Med.* 2004; 137: 268-272.
28. Chiu D, Claster S. Measurement of red cell membrane oxidation and generation of oxidative intermediates. In: Shohet S, Mohandas N, eds. Red cell membranes. New York: Churchill Livingstone; 1988:203-235
29. Tavazzi B, Di Pierro D, Amorini AM, et al. Energy metabolism and lipid peroxidation of human erythrocytes as a function of increased oxidative stress. *Eur J Biochem.* 2000;267: 684-689.
30. Hebbel RP, Miller WJ. Phagocytosis of sickle erythrocytes: immunologic and determinants of hemolytic anaemia. *Blood.* 1984;64:733-741.
31. Low P, Waugh SM, Zinke K, et al. The role of haemoglobin denaturation and band 3 clustering in red blood cell aging. *Science.* 1985; 227:522-531.
32. Jain SK, Yip R, Hoesch RM, et al. Evidence of peroxidative damage to the erythrocyte membrane in iron deficiency. *J Clin Nutr.* 1983; 37: 26-39.

3.2 Material e Métodos Suplementares

3.2.1 Sujeitos

Foram coletadas 35 amostras de sangue total de indivíduos de ambos os sexos, com idade superior a 65 anos, provenientes de Unidades de Atenção Básica da Saúde da região norte do estado do Rio Grande do Sul. Esses pacientes eram acompanhados pela equipe de Saúde da Família e faziam parte do projeto de pesquisa da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, intitulado “Atenção Farmacêutica”. A anemia ferropênica foi definida de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde que define níveis de hemoglobina menor que 13 g/dL para homens e menor que 12 g/dL para mulheres. Pacientes fumantes, alcoolistas, com *diabetes mellitus*, artrite reumatóide, tumores, catarata, disfunção renal, doença de Parkinson, Mal de Alzheimer foram excluídos da amostragem. Destas amostras, 17 indivíduos apresentaram anemia ferropênica, de acordo com os critérios estabelecidos e 18 apresentaram níveis normais de hemoglobina. A hipertensão foi associada devido à dificuldade de encontrar indivíduos idosos saudáveis, no entanto esta patologia foi homogênea em ambos os grupos. Para definir os indivíduos hipertensos, usou-se como critério o diagnóstico médico, confirmado pelo paciente através da carteirinha de hipertenso. As amostras foram coletadas por venipunção, por pessoal capacitado. Foram realizadas dosagens de ferro e ferritina para definição dos pacientes no grupo controle e grupo com anemia ferropênica. Os

participantes da pesquisa assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 1).

Os hemogramas e análises de ferro e ferritina foram realizados na Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – campus Erechim (URI-Erechim) e as demais dosagens no laboratório de Estresse Oxidativo do departamento de Biofísica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da URI-Erechim.

3.2.2 Amostras Clínicas

O sangue periférico (10 mL) foi coletado por punção venosa realizada por profissionais capacitados, utilizando EDTA 5% e citrato 2% como anticoagulantes e tubo sem anticoagulante com gel separador. O plasma foi removido após consecutivas centrifugações (10 min, 1500 g) e lavado com NaCl (0,9% p/v). Os eritrócitos foram ressuspensos em PBS (50 mM NaCl, 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$, pH 7,4). Para a obtenção dos extratos, as hemácias foram lisadas utilizando etanol 2% (1:10).

3.2.3 Capacidade antioxidante total

Para determinar a capacidade antioxidante total no plasma foi utilizado o Kit RANDOX[®] (RANDOX BRASIL Ltda). O ABTS[®] (2,2'-Azino diethylbenzothiazoline sulfonic acid) é incubado com a peroxidase e H_2O_2 para gerar o cátion $\text{ABTS}^{\text{®}*+}$, que é um composto relativamente estável e apresenta coloração

azul-esverdeada, o qual é medido a 600nm. As substâncias antioxidantes presentes na amostra inibem esta reação produzindo uma redução na intensidade da cor proporcional à concentração de antioxidantes totais.

3.2.4 Ensaio da Glutathiona Total (GSH) – defesa não enzimática

A quantificação da glutathiona total (GSH) nas hemácias foi feita a 412 nm, observando o aparecimento de uma coloração amarela, produto da oxidação do ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico (DTNB). O padrão contendo 1 mM GSSG e o branco foram medidos separadamente (AKERBOOM & SIES, 1981).

3.2.5 Quantificação da Vitamina C

A vitamina C foi quantificada por HPLC segundo o método descrito por Karatepe (2004). Após o soro ter sido desproteínizado com ácido perclórico 0,1M, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 4500 g. O método analisa amostras aquosas contendo vitamina C, usando a coluna LC-18-DB e detecção espectrofotométrica (Chemical Laboratory LC – 10AD Shimadzu) a 250 nm. Os cromatogramas obtidos foram analisados pelo software EZChrom (Analysis System version 1.63). A fase móvel era composta por 82,5:17,5 (v/v) de fosfato de potássio monobásico 30 mM (pH 3,6) e metanol. O fluxo foi mantido a 1,2 mL/min e os cromatogramas foram monitorados a 250 nm. Foi traçada uma curva de calibração utilizando 2,5; 12,5 e 25 mM do padrão da vitamina C.

3.2.6 Descarte de reagentes

O descarte do material biológico foi realizado segundo resolução da diretoria colegiada – RDC 306, de 7 de dezembro de 2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

3.3 Resultados Suplementares

3.3.1 Características dos grupos avaliados

A Tabela 5 mostra os resultados do eritrograma encontrado no grupo controle e no grupo com anemia ferropênica.

Tabela 5. Características clínicas dos indivíduos controle e pacientes com anemia ferropênica

Características	Controles	Anemia Ferropênica
Número de sujeitos	18	17
Idade (anos)	76 ± 6	75 ± 7
eritrócitos (milhões/mm ³)	4.49 ± 0.30	3.80 ± 0,41*
Hemoglobina (g/dL)	13.44 ± 1.00	10.41 ± 0.9*
Hematócrito (%)	40.63 ± 2.66	33.14 ± 2.90*
VCM	91,46 ± 4,65	82,42 ± 6,23
CHCM	33,28 ± 0,6	32,19 ± 1,43
RDW	13,29 ± 1,13	15,62 ± 1,43
Ferro total (mg/L)	89.17±10.58	45.82±11.10*
Ferritina (ng/mL)	223.17±101.17	37.88±17.13*

* valores abaixo dos níveis fisiológicos normais

Os valores são expressos como média ± DP. VCM: volume corpuscular médio; CHCM: concentração de hemoglobina corpuscular média; RDW: coeficiente de variação ao redor da média do volume dos eritrócitos

3.3.2 Capacidade Antioxidante Total

Os resultados da avaliação da capacidade antioxidante total não mostraram diferença entre os grupos avaliados (figura 3).

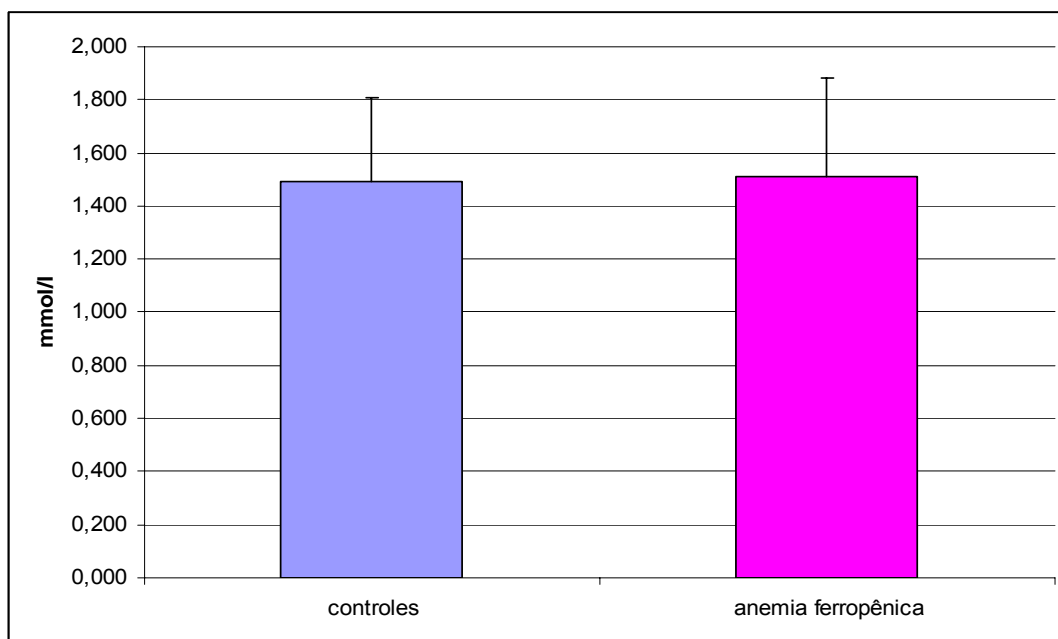


Figura 3. Capacidade antioxidante total em plasma de indivíduos controles e pacientes com anemia ferropênica. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

3.3.3 Ensaio da Glutaciona Total

A concentração de glutaciona total não mostrou diferença significativa entre os grupos (figura 4).

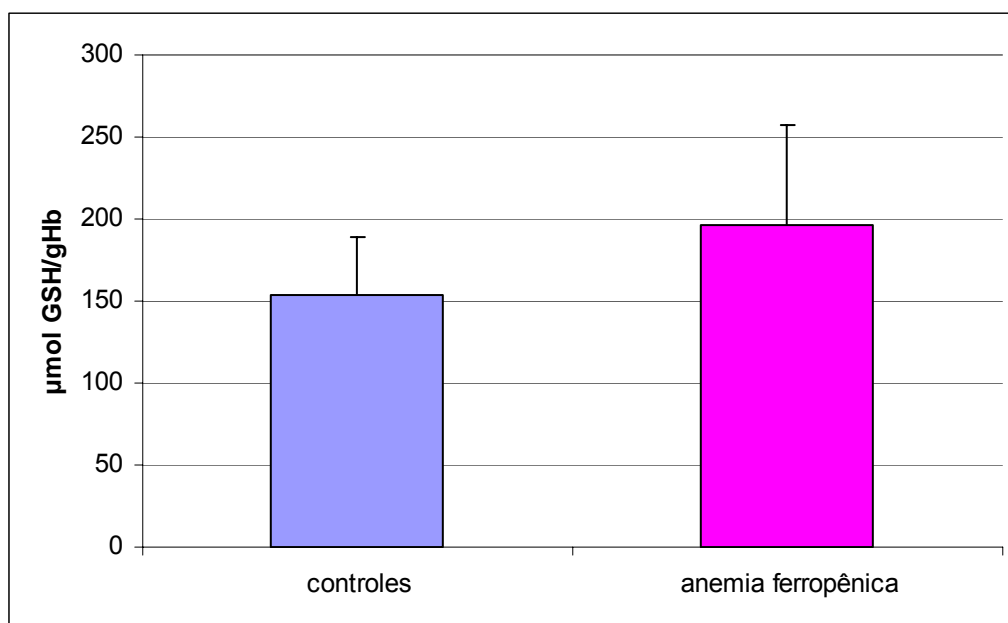


Figura 4. Glutaciona Total (GSH) em eritrócitos de indivíduos controle e pacientes com anemia ferropênica. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

3.3.4 Níveis de Vitamina C em Soro

Na quantificação dos níveis séricos de vitamina C, os resultados não mostraram diferença estatística entre os grupos avaliados (figura 5).

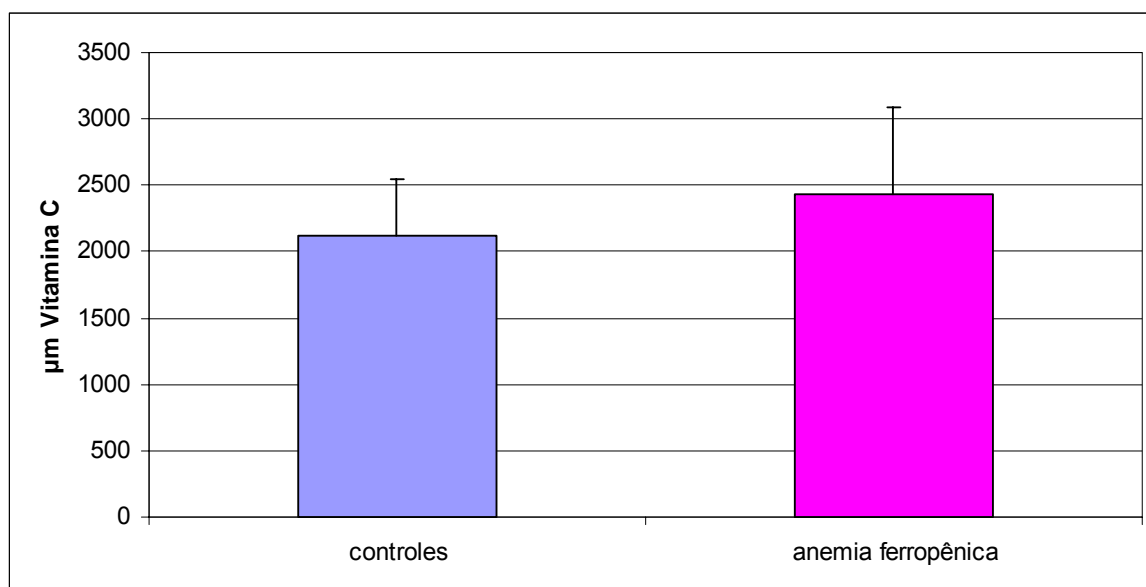


Figura 5. Níveis de Vitamina C em soro de indivíduos controles e pacientes com anemia ferropênica. Os valores são expressos como média \pm desvio padrão.

4. DISCUSSÃO

Muitos estudos têm sido conduzidos avaliando o estresse oxidativo na presença de sobrecarga de ferro, mas pouco se tem estudado na deficiência de ferro. Esse trabalho teve como objetivo avaliar o estresse oxidativo em pacientes idosos com anemia ferropênica.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) é parte integrante do metabolismo humano e é observada em diversas condições patológicas. A presença de anemia é uma condição muito comum em pessoas idosas e não deve ser considerada como uma consequência inevitável do processo de envelhecimento, devendo receber adequada atenção na prática clínica.

Neste estudo foram encontrados valores de eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, ferro e ferritina abaixo dos níveis normais, como esperado para o grupo com anemia ferropênica. O RDW (Red cell distribution width), que é um índice que avalia a variação de tamanho das hemácias mostrou-se aumentado (anisocitose), no entanto a morfologia eritrocitária não mostrou microcitose e hipocromia (Tabela 5).

Na deficiência de ferro uma anemia normocrômica normocítica, com anisocitose, precede o desenvolvimento de anisocromia, hipocromia e microcitose. As alterações morfológicas não costumam ser evidentes até a queda abaixo de 10-11 g/dL, quando aparece, então, o aspecto característico (BAIN, 1997).

Os valores de hemoglobina mostraram uma anemia leve, o que é comum de ser observado em idosos, principalmente em indivíduos ambulatoriais. No

entanto, estudos revelam que mesmo sendo uma leve anemia, ela apresenta efeitos adversos sobre essa população, interferindo na qualidade de vida, na habilidade para exercer atividade física e na manutenção do estado funcional, particularmente relacionado à mobilidade (GURALNIK et al, 2004).

Os eritrócitos são células que possuem um sistema enzimático muito específico capaz de reduzir e neutralizar os radicais livres (RL). A primeira linha de enzimas antioxidantes é a SOD, que catalisa a dismutação do ânion superóxido (O_2^-) em H_2O_2 e este, por sua vez, é convertido em H_2O e O_2 pela ação da CAT e da GPx sinergicamente com a GSH. A GPx pode também reduzir peróxidos orgânicos em seus correspondentes alcoóis (CHENG et al, 2001). No presente estudo, foi observada elevada atividade da SOD no grupo com anemia ferropênica comparado ao grupo controle (Tabela 2 do artigo). Esta elevada atividade eritrocitária da SOD pode ser uma resposta compensatória, secundária ao aumento do estresse oxidativo. Uma possível hipótese para o aumento do estresse oxidativo nos eritrócitos pode ser um acúmulo anormal de H_2O_2 (JANSON et al, 1985) e eritrócitos deficientes de ferro possuem aumentada susceptibilidade à hemólise na exposição *in vitro* a peróxido de hidrogênio (MELHORN, 1971). A CAT, enzima responsável pela conversão de H_2O_2 a H_2O e O_2 , também mostrou elevada atividade (Tabela 2 do artigo). Apesar da CAT não ser essencial para alguns tipos de células em condições normais, ela desempenha um papel importante na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo na resposta adaptativa da célula (GADJEVA et al, 2005)

A atividade da GPx, por sua vez, não mostrou diferença entre os grupos analisados (Tabela 2 do artigo). Resultados semelhantes também foram

encontrados por Acharya e colaboradores (1991) que estudaram pacientes com anemia por deficiência de ferro, com idade entre 28 e 42 anos e também por VIVES CORRONS e colaboradores (1995) que avaliaram 20 pacientes com anemia por deficiência de ferro, e em contraste com os resultados de muitos autores que encontraram decréscimo na atividade da GPx (RODVIEN et al, 1974; CELLERINO et al, 1976; KURTOGLU et al, 2003). Pode-se especular que o ferro não é a única causa de mudanças na atividade da GPx, mas outros minerais como cobre, zinco, manganês e selênio, que mediam a atividade desta enzima, podem ter importante papel na alteração da atividade enzimática. Segundo ISLER e colaboradores (2002), tem sido descrito que a atividade das enzimas da via da pentose fosfato, a maior fonte de produção de NADPH, estava aumentada em pacientes com anemia por deficiência de ferro. Uma vez que a atividade de GPx depende de NADPH produzido pela via da pentose fosfato, isto pode explicar porque a atividade da GPx foi similar entre os grupos. Neste trabalho não foram avaliadas as enzimas da via da pentose fosfato, sendo um dado interessante para ser avaliado posteriormente, para confirmar esta hipótese.

A proporção de GSH para glutathiona oxidada (GSSG) é alta nas células normais. A conversão de GSSG para GSH é feita pela enzima glutathiona redutase, que catalisa esta reação utilizando NADPH como acceptor de elétrons (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Assim, os níveis de GSH influenciam a atividade da GPx e, ela mesma, atua como um importante composto antioxidante. GSH é formada a partir de seus aminoácidos constituintes: glutamato, cisteína e glicina (LARSSON *et al.*, 1983). Assim como os resultados de GPx, a

concentração de GSH também foi similar entre os grupos (figura 4). Isso indica que a concentração de GSH foi suficiente para manter a atividade da GPx.

Os antioxidantes não enzimáticos estão presentes em fluidos intra e extracelulares e alguns deles vêm da dieta. Além da GSH, outro antioxidante não enzimático avaliado foi a vitamina C. A vitamina C (ácido ascórbico) é o mais potente antioxidante extracelular. Os resultados encontrados foram similares entre os grupos avaliados (figura 5). Este resultado poderia ser melhor avaliado com um questionário alimentar, devido a sua relação com a ingestão de vitamina C oriunda principalmente dos alimentos. Segundo dados de ARANHA e colaboradores (2000), a população idosa possui uma deficiência de vitamina C considerando seus hábitos alimentares muitas vezes inadequados.

Um grupo de pesquisadores tem mostrado que eritrócitos deficientes de ferro têm aumentada rigidez de membrana, aumentada susceptibilidade à hemólise por inibidores de grupos sulfidríla da membrana (CARD & WEINTRAUB, 1971) e maior susceptibilidade à hemólise por peróxido de hidrogênio (RAMACHANDRAN & IYER, 1984). Estas observações sugerem que um defeito metabólico deve estar presente nos eritrócitos deficientes de ferro permitindo que o dano oxidativo na membrana possa ocorrer. Alterações na membrana podem resultar em aumento da rigidez celular, aumento do seqüestro no baço e outros órgãos e destruição celular prematura (RODVIEN et al, 1974). Estas alterações podem ocorrer devido à peroxidação lipídica que é inicializada por ROS e pode resultar em dano celular reversível ou irreversível (KNUTSON et al, 2000). Um dos produtos secundários da peroxidação lipídica é o MDA, que pode ser dosado , para verificar se existe dano em lipídios. Neste estudo observamos um aumento

significativo nos níveis de MDA comparado ao grupo controle (Tabela 3 do artigo), sugerindo que mesmo na deficiência de ferro ocorre dano oxidativo em lipídios. Resultados similares também foram encontrados por BARTAL et al (1993). Eritrócitos deficientes de ferro sofrem peroxidação dos ácidos graxos da membrana e a formação de um subproduto, o MDA. Este pode reagir com aminofosfolipídios e proteínas da membrana para produzir ligação cruzada de constituintes da membrana, causando diminuição na deformabilidade eritrocitária na deficiência de ferro. Isto pode ser responsável pela reduzida sobrevivência destes eritrócitos (JAIN et al, 1983).

Outra medida de dano oxidativo, é a presença de grupamentos carbonil, que resulta em dano oxidativo em proteínas, pois são formados pela oxidação das cadeias laterais dos aminoácidos lisina, prolina, arginina e treonina.

Este foi o primeiro trabalho que avaliou o dano em proteínas em pacientes com anemia por deficiência de ferro. O nível de grupamentos carbonil no plasma foi maior no grupo com anemia ferropênica do que no grupo controle (Tabela 3 do artigo), porém não houve diferença no nível de grupamentos carbonil no hemolisado celular (Tabela 3 do artigo).

Entre as proteínas plasmáticas, o fibrinogênio é o hexâmero mais susceptível à oxidação por radicais livres. Aproximadamente 21,5% dos aminoácidos que constituem este polipeptídeo são passíveis de sofrer oxidação e serem detectados pelo método de carbonil (SHACTER et al, 1994). O fibrinogênio estimula a migração e proliferação de células do músculo liso, promove agregação plaquetária, aumenta a viscosidade sanguínea e exibe atividade angiogênica e mitogênica (ASEICHEV & AZIZOVA, 2004).

É conhecido que eritrócitos são muito susceptíveis ao dano oxidativo devido ao alto grau de ácidos graxos poliinsaturados na sua membrana e a alta concentração de oxigênio e hemoglobina intracelular (GADJEVA et al, 2005). Além disso, o ferro também é conhecido como indutor de estresse oxidativo via reação de Fenton. No entanto na anemia ferropênica, onde ocorre deficiência deste metal encontrou-se dano oxidativo. Então, se sugere que devido à baixa concentração de hemoglobina, ocorre um excesso de cadeias globínicas (protoporfirina) que se autoxidam produzindo superóxido oito vezes mais que a hemoglobina normal. Além do excesso de protoporfirina, elevados níveis de cobre, que também é um oxidante conhecido, foram encontrados na deficiência de ferro. Estes podem gerar espécies reativas de oxigênio para iniciar peroxidação lipídica na membrana do eritrócito (JAIN et al 1983).

Muitos autores também relatam a reduzida atividade de glutathione peroxidase, catalase e/ou vitamina E necessária para detoxificar peróxido intracelular (JAIN et al, 1983. No entanto neste trabalho não encontramos deficiência na glutathione peroxidase, a atividade da catalase mostrou-se elevada e vitamina E não foi avaliada.

Com estes dados conclui-se que mesmo havendo anemia moderada houve estresse oxidativo em pacientes com anemia ferropênica e isso reforça a necessidade de diagnosticar e tratar esses pacientes para diminuir a magnitude dos efeitos da anemia na saúde do idoso.

5. PERSPECTIVAS DO ESTUDO

- ❖ Incluir um número maior de indivíduos por grupo estudado;
- ❖ Medir os níveis de peróxido de hidrogênio em plasma;
- ❖ Medir os níveis de vitamina E em soro;
- ❖ Medir os níveis de cobre;
- ❖ Medir níveis de protoporfirina
- ❖ Dosar vitamina B₁₂ e ácido fólico
- ❖ Medir capacidade total de ligação do ferro e transferrina;
- ❖ Medir a atividade de enzimas da via da pentose fosfato.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHARYA, J.; PUNCHARD, N.A.; TAYLOR, J.A.; THOMPSON, R.P.H. & PEARSON, T.C. Red cell lipid peroxidation and antioxidant enzymes in iron deficiency. *European Journal of Haematology*, 47: 287-291, 1991.

ARANHA, F.Q.; BARROS, Z.F.; MOURA, L.S.A.; GONÇALVES, M.C.R.; BARROS, J.C.; METRI, J.C. & SOUZA, M.S. O papel da vitamina C sobre as alterações orgânicas no idoso. *Revista de Nutrição*, 13(2): 89-97, 2000.

AKERBOOM, T.P.M. & SIES, H. Assay of Glutathione Disulfide, and Glutathione Mixed Disulfides in Biological Samples. *Methods in Enzymology*, 77: 373-382, 1981.

ANIA, B.J.; SUMAN, V.J.; FAIRBANKS, V.F.; RADEMACHER, D.M. & MELTON, L.J. Incidence of anemia in older people: an epidemiologic study in a well defined population. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45:825-831, 1997.

ARTZ, A.S.; FERGUSSON, D.; DRINKA, P.J.; GERALD, M.; BIDENBENDER, R.; LECHICH, A.; SILVERSTONE, F.; MCCAMISH, M.A.; DAI, J.; KELLER, E. & ERSHLER, W.B. Mechanisms of unexplained anemia in the nursing home. *Journal of the American Geriatrics Society*, 52: 423-427, 2004.

ASEICHEV, A.V. & AZIZOVA, O.A. Mechanism of activation of ADP-induced platelet aggregation under the influence of oxidatively modified fibrinogen. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 137: 268-272, 2004.

ASLAN, M.; HOROZ, M.; KOCYIGIT, A.; OZGONÜL, S.; CELIK, H.; CELIK, M. & EREL, O. Lymphocyte DNA damage and oxidative stress in patients with iron deficiency anemia. *Mutation Research*, 601: 144-149, 2006.

ATANASIU, V.; MANOLESCU, B. & STOIAN, I. Hcpidin - central regulator of iron metabolism. *European Journal of Haematology*, 78: 1-10, 2007.

BAIN, B. *Células sanguíneas: um guia prático*. Porto Alegre, Artmed, Cap. 8, p. 204, 1997.

BARTAL, M.; MAZOR, D.; DVILANSKY, A. & MEYERSTEIN, N. Iron deficiency anemia: recovery from in vitro oxidative stress. *Acta Haematologica*, 90: 94-98, 1993.

CALADO, R.T.; ALBERTO, F.L. & FALCÃO, R.P. METABOLISMO DO FERRO. In: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P. & PASQUINI, R. *Hematologia Fundamentos e Prática*. São Paulo, Atheneu, Cap. 22, p. 213-222, 2004.

CAMARANO, A.A. *Muito além dos 60: os novos idosos brasileiros*. Instituto de Pesquisa Econômica Aplicada. Rio de Janeiro: IPEA, p. 221-50, 1999.

CAMARANO, A.A.; BELTRÃO, K.I.; PASCOM, A.R.P.; MEDEIROS, M.; CARNEIRO, I.G.; GOLDANI, A.M.; VASCONCELOS, A.M.N.; CHAGAS, A.M.R. & OSÓRIO, R.G. *Como vai o idoso brasileiro?* Rio de Janeiro: IPEA, 57p., 1999.

CARD, R.T. & WEINTRAUB, L.R. Metabolic abnormalities of erythrocytes in severe iron deficiency. *Blood*, 37: 725-732, 1971.

CELLERINO, R.; GUIDI, G. & PERONA, G. Plasma iron and erythrocytic glutathione peroxidase activity: a possible mechanism for oxidative hemolysis in iron deficiency anemia. *Scandinavian Journal of Haematology*, 17: 111-116, 1976.

CHAVES, P.H.M.; ASHAR, B.; GURALNIK, J.M. & FRIED, L.P. Looking at the relationship between hemoglobin concentration and prevalent mobility difficulty in older women. Should the criteria currently used to define anemia in older people be reevaluated? *Journal of the American Geriatrics Society*, 50: 1257-1264, 2002.

CHENG, T.Y.; ZHU, Z.; MASUDA, S. & MORCOS, N.C. Effects of multinutrient supplementation on antioxidant defense systems in healthy human beings. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 12: 388-395, 2001.

CIMEN, M.Y.B. Free radical metabolism in human erythrocytes. *Clinica Chimica Acta*, 390: 1-11, 2008.

CLASTER, S.; CHIU, D.T. & LUBIN, B. Neutrophils mediate lipid peroxidation in human red cells. *Blood*, 64: 1079-1084, 1984.

DAILLY, E.; URIEN, S.; BARRÉ, J.; REINERT, P. & TILLEMENT, J.P. Role of Bilirubin in the Regulation of the Total Peroxyl Radical Trapping Antioxidant Activity of Plasma in Sickle Cell Disease. *Biochemical and Biophysical Communications*, 248: 303-306, 1998.

DALY, M.P. Anemia in the elderly. *American Family Physician*, 39:129-36, 1989.

DENNY, S.D.; KUCHIBHATLA, M.N. & COHEN, H.J. Impact of anemia on mortality, cognition, and function in community-dwelling elderly. *American Journal of Medicine*, 4(119):327-334, 2006.

DUMASWALA, U.J.; ZHUO, L.; JACOBSEN, D.W.; JAIN, S.K. & SUKALSKI, K.A. Protein and lipid oxidation of banked human erythrocytes: role of glutathione. *Free Radical Biology & Medicine*, 27: 1041-1049, 1999.

DUNN, L.L.; RAHMANTO, Y.S. & RICHARDSON, D.R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in Cell Biology*, 17: 93-100, 2006.

EISENSTAEDT, R.; PENNINX, B.W.J.H. & WOODMAN, R.C. Anaemia in the elderly: Current understanding and emerging concepts. *Blood Reviews*, 20:213-226, 2006.

ELSBACH, P. & WEISS, P. A reevaluation of the roles of O₂- dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. *Reviews of infectious diseases*, 5(5): 843-853, 1983.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C. & TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55: 333-339, 2001.

EZEKOWITZ, J.A.; MCALISTER, F.A. & ARMSTRONG, P.W. 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*, 107:223-225, 2003.

GABRILOVE, J. Anaemia and the elderly: clinical considerations. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 18: 417-422, 2005.

GADJEVA, V.; KUCHUKOVA, D. & GEORGIEVA, R. Vitamin combinations reduce oxidative stress and improve antioxidant status in patients with iron deficiency anemia. *Comparative Clinical Pathology*, 14: 99-104, 2005.

GUIGOZ Y, VELLAS B. & GARRY, P.J. Assessing the nutritional status of the elderly: the mini nutritional assessment as part of the geriatric evaluation. *Nutrition. Reviews*, v.54(1) (part II): 59S-65S, 1996.

GURALNIK, J.M.; EISENSTAEDT, R.S.; FERRUCCI, L.; KLEIN, H.G. & WOODMAN, R.C. Prevalence of anemia in persons 65 years and older in the United States: evidence for a high rate of unexplained anemia. *Blood*, 104: 2263-2268, 2004.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd ed, New York, Oxford University Press, 2007.

HERNDON, J.G.; HELMICK, C.G. & SATTIN R.W. Chronic medical conditions and risk of fall injury events at home in older adults. *Journal of the American Geriatrics Society*, 45:739-743, 1997.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2000: características gerais da população: resultado da amostra. Rio de Janeiro: IBGE, 2001. Disponível em:
http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/censo2000_populacao.pdf. Acessado em março de 2008.

ISLER, M.; DELIBAS, N.; GUCLU, M.; GULTEKIN, F. ; SUTCU, R. ; BAHCECI, M. & KOSAR, A. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase in erythrocytes of patients with iron deficiency anemia: effects of different treatment modalities. *Croatian Medical Journal*, 43(1): 16-19, 2002.

IZAKS, G.J.; WESTENDORP, R.G.J. & KNOOK, D.L. The definition of anemia in older persons. *Journal of the American Medical Association*, 281: 1714-1717, 1999.

JAIN, S.K.; YIP, R.; HOESCH, R.M.; PRAMANIK, A.K.; DALLMAN, P.R. & SHOHET, S. Evidence of peroxidative damage to the erythrocyte membrane in iron deficiency. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37: 26-39, 1983.

JANSSON, L.T.; PERKKIÖ, M.V.; WILLIS, W.T.; REFINO, C.J. & DALLMAN, P.R. Red cell superoxide dismutase is increased in iron deficiency anemia. *Acta Haematologica*, 74: 218-221, 1985.

JOHNSON, R.M.; GOYETTE JR, G.; RAVINDRANATH, Y. & HO, Y.S. Hemoglobin autoxidation and regulation of endogenous H₂O₂ levels in erythrocytes. *Free Radical Biology & Medicine*, 39: 1407-1417, 2005.

JOLOBE, O.M.P. Does this elderly patient have iron deficiency anaemia, and what is the underlying cause? *Postgraduate Medical Journal*, 76: 195-198, 2000.

KALACHE A.; VERAS R.P. & RAMOS L.R. O envelhecimento da população mundial: um desafio novo. *Revista de Saúde Pública*, 21: 200-210, 1987.

KARATEPE, M. Simultaneous determination of ascorbic acid and free malondialdehyde in human serum by HPLC-UV. *LCGC North America*, 22: 362-365, 2004.

KNUTSON, M.D.; WALTER, P.B.; AMES, B.N. & VITERI, F.E. Both iron deficiency and daily iron supplements increase lipid peroxidation in rats. *Journal of Nutrition*, 130: 621-628, 2000.

KURTOGLU, E.; UGUR, A.; BALTACI, A.K. & UNДАР, L. Effect of iron supplementation on oxidative stress and antioxidant status in iron-deficiency anemia. *Biological Trace Element Research*, 96: 117-123, 2003.

LARSSON, A.; HOLMGREN, A.; ORRENIUS, A. & MANNERVIK, B. *Functions of glutathione: biochemical, physiological, toxicological, and clinical aspects*. New York: Raven Press, 1983.

LEE, R.G. Anemias microcíticas e distúrbios com síntese prejudicada da hemoglobina. In: LEE, G.R.; BITHHELL, T.C.; FOERSTER, J.; ATHENS, J.W. & LUKENS, J.N. *Wintröbe - Hematologia Clínica*. São Paulo, Manole, vol. 1, cap. 5, p. 865-883, 1998.

LIND, M.; VERNON, C.; CRUICKSHANK, D.; WILKINSON, P.; LITTLEWOOD, T.; STUART, N.; JENKINSON, C.; GREY-AMANTE, P.; DOLL, H. & WILD, D. The level of haemoglobin in anaemic cancer patients correlates positively with quality of life. *British Journal of Cancer*, 86:1243-1249, 2002.

LIPSCHITZ, D.J. Medical and functional consequences of anemia in the elderly. *Journal of the American Geriatrics Society*, 51:S10-13, 2003.

MAHAN, L.K. & SCOTT-STUMP, S.K. *Alimentos, Nutrição e dietoterapia*. 9ª ed. São Paulo: Editora Rocca, 1998.

MARALDI, C.; VOLPATO, S.; CESARI, M.; CAVALIERI, M.; ONDER, G.; MANGANI, I.; WOODMAN, R.C.; FELLIN, R. & PAHOR, M. Anemia and recovery from disability in activities of daily living in hospitalized older persons. *Journal of the American Geriatrics Society*, 54: 632-636, 2006.

MELHORN, D.K.; GROSS S.; LAKE, G.A. & LEU, J.A. The hydrogen peroxidase fragility test and serum tocopherol level in anemias of various etiologies. *Blood*, 37: 438-446, 1971.

NAIRZ, M. & WEISS, G. Molecular and clinical aspects of iron homeostasis: from anemia to hemochromatosis. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 118(15-16):442-462, 2006.

NAOUM, P.C. Radicais livres em eritrócitos falcêmicos e talassêmicos. *Boletim da Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, 18: 75-81, 1996.

PAIVA, A.A.; RONDÓ, P.H.C. & GUERRA-SHINOHARA, E.M. Parâmetros para avaliação do estado nutricional de ferro. *Revista de Saúde Pública*, 34(4): 421-426, 2000.

PENNINX B.W.; GURALNIK, J.M.; ONDER, G.; FERRUCCI, L.; WALLACE, R.D. & PAHOR, M. Anemia and decline in physical performance among older persons. *American Journal of Medicine*, 115:104 – 110, 2003.

RAMACHANDRAN, M. & IYER, G.Y.N. Erythrocyte membrane lipid peroxidation in iron deficiency anemia. *Experientia*, 40: 173-174, 1984.

REBOUÇAS, M. & PEREIRA, M.G. Indicadores de saúde para idosos: comparação entre o Brasil e os Estados Unidos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 23(4):237–246. 2008

RODVIEN, R.; GILLUM, A. & WEINTRAUB, L.R. Decreased glutathione peroxidase activity secondary to severe iron deficiency: A possible mechanism responsible for the shortened life span of the iron-deficient red cell. *Blood*, 43 (2): 281-289, 1974.

SHACTER, E.; WILLIAMS, J.A.; LIM, M. & LEVINE, R.L. Different susceptibility of plasma proteins to oxidative modification: examination by Western blot immunoassay. *Free Radical Biology & Medicine*, 17: 429-437, 1994.

SHALEV, O.; LEIDA, M.N.; JACOB, H.S. & EATON, J.W. Abnormal erythrocyte calcium homeostasis in oxidant-induced hemolytic disease. *Blood*, 58: 1232-5, 1981.

SMITH, D.L. Anemia in the elderly. *American Family Physician*, 62: 1565-1572, 2000.

TAPIERO, H.; GATÉ, L. & TEW, K.D. Iron: deficiencies and requirements. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 55: 324-332, 2001.

THOMAS D.R. Anemia and Quality of Life: Unrecognized and Undertreated. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 59(3): 238-241, 2004.

THOMAS, S.; LOWE, J.E.; KNOWLES, R.G.; GREEN, I.C. & GREEN, M.H.L. Factors affecting the DNA damaging activity of superoxide and nitric oxide. *Mutation Research*, 402: 77-84, 1998.

VIVES CORRONS, J.L.; MIGUEL-GARCÍA, A.; MIGUEL-SOSA, A.; CAMBIAZZO, S.; LINARES, M.; DIBARRART, M.T. & CALVO, M.A. Increased susceptibility of microcytic red blood cells to *in vitro* oxidative stress. *European Journal of Haematology*, 55: 327-331, 1995.

WHO/UNICEF. Focusing on anaemia. Towards an integrated approach of effective anaemia control. Geneva, World Health Organization, 2004, disponível em http://www.who.int/topics/anaemia/en/who_unicef-anaemiastatement.pdf, acesso em 22/03/2008.

WHO/UNICEF/UNU. Iron deficiency anaemia. Assessment, prevention and control – a guide for programme managers. Geneva, World Health Organization, 2001, disponível em http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf, acesso em 22/03/2008.

WHO. Nutritional anemia: report of a WHO Scientific Group. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1968.

ANEXO 1**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Número: _____

Prezado Paciente

A anemia ferropênica é uma distúrbio que acomete indivíduos idosos e crianças devido a carências nutricionais de ferro. É causada por uma alteração na composição da hemoglobina – proteína transportadora de oxigênio - fazendo com que as células vermelhas do sangue diminuam seu tamanho e composição. É caracterizada por fadiga, retardo do crescimento, retardo do desenvolvimento neuropsicomotor, comprometimento da imunidade celular e diminuição da capacidade intelectual.

Este projeto de pesquisa, para o qual estamos pedindo a sua participação, tem como objetivo principal avaliar estresse oxidativo de indivíduos idosos com anemia ferropênica.

Para o desenvolvimento deste trabalho, precisamos de um grupo de pessoas maiores de 65 anos com hipertensão e com anemia ferropênica e outro grupo de pessoas maiores de 65 anos com hipertensão e sem anemia ferropênica.

É necessário apenas que os participantes do estudo com anemia em investigação colem uma amostra de sangue (10 ml), que será realizada por profissional habilitado e com todas as técnicas adequadas.

Estas amostras de sangue serão analisadas para verificar a presença de anemia e para avaliar o “estado oxidativo do paciente”.

Os riscos associados ao presente estudo são apenas os de uma coleta de sangue venoso. Pode haver um pequeno hematoma, isto é, um pequeno derramamento de sangue no local da coleta. Lembramos que todo material utilizado é descartável e estéril e o profissional que irá realizar a coleta está capacitado para esta função. Além disso, a quantidade de sangue coletada não fará falta alguma ao paciente.

O resultado do exame lhe será comunicado, caso sejam detectadas alterações na molécula de hemoglobina e/ou deficiências enzimáticas.

Eu, _____, fui informado do objetivo deste trabalho de forma clara e detalhada, bem como sobre o procedimento no qual estarei envolvido, dos desconfortos previstos, tanto quanto dos benefícios esperados. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Além disso, sei que novas informações obtidas durante o estudo me serão fornecidas e terei a liberdade de retirar meu consentimento de participação na pesquisa, se assim o desejar, sem prejuízo para o meu tratamento.

O (a) profissional _____ certificou-me de que todas as informações por mim fornecidas serão utilizadas apenas para fins do presente projeto de pesquisa e serão divulgadas de forma anônima.

() Concordo com a coleta e a utilização do material obtido.

Paciente:

Pesquisador: Dra. Mara Benfato

Data: _____

Telefone para esclarecimentos: 0 XX 51-33167603

Anexo 2: Curriculum Vitae**Baccin, A.C.****1. Dados Pessoais****Nome:** Aline Coghetto Baccin**Data de Nascimento:** 16/06/1979**Local:** Erechim, RS, Brasil**Telefone:** (54) 99760523**E-mail:** acoghetto@yahoo.com.br**2. Formação Acadêmica / Titulação**

- ❖ Mestrado em Biologia Celular e Molecular – PPGBCM Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Período: Set/2006- out/2008. Orientador: Prof. Dra. Mara da Silveira Benfato.
- ❖ Graduação em Farmácia – Análises Clínicas – Universidade de passo Fundo (UPF). Período 1997-2002.

3. Experiência Profissional ou Didática anterior

- ❖ Hospital São Vicente de Paulo (HSVP) – Passo Fundo, farmacêutica do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar. Fev/02 a Dez/04.
- ❖ Escola de Enfermagem do HSVP – professora de farmacologia para o curso Técnico em Enfermagem. Mar/03 a Dez/03.
- ❖ Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus Erechim. Professora do curso de Farmácia nas disciplinas de Farmácia Hospitalar e Toxicologia Clínica e no curso de Nutrição na disciplina de Histologia e Embriologia. Mar/05 a Jul/07.
- ❖ Farmácia Farma Vida – Campinas do Sul, farmacêutica e proprietária. Desde Dez/04.

4. Apresentação em Eventos e Publicação de Resumos

- ❖ MANFREDINI, V.; DAL VESCO, M. A.; BACCIN, A. C.; LAZZARETTI, L. L.; GRIEBELER, I.; NUNES, V. T.; BIASI, L.; SERAFIN, P. M.; BENFATO, M. S. Avaliação do dano oxidativo em proteínas plasmáticas e do hemolisado celular em pacientes homocigotos para a Anemia Falciforme. In: XX Congresso Brasileiro de Genética Médica, 2008, Gramado. Livro de Resumos, 2008. p. 82-82

- ❖ BACCIN, A. C.; MARCOLIN, M.; MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. S. Oxidative protein damage in patients with iron deficiency anaemia (IDA). In: XI Congress of the PABMB, 2008, Águas de Lindóia SP. CD BOOK, 2008.

- ❖ DAL VESCO, A. M.; BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V. Soroprevalência de Toxoplasmose em um grupo de gestantes da Unidade Básica de Saúde Centro, Erechim, RS. In: 28 Semana Científica do HCPA, 2008, Porto Alegre. Revista HCPA. Porto Alegre, 2008. v. 28. p. 160-160.

- ❖ BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. S. Oxidative stress in older patients with iron deficiency anaemia (IDA). In: Free Radicals in Montevideo 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo 2007. p. 15-15.

- ❖ MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; MARTINS, V. D.; BACCIN, A. C.; BENFATO, M. S. Blood antioxidant parameters in sickle cell trait subjects and sickle cell anaemia patients. In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007, Montevideo. Free Radicals in Montevideo 2007, 2007. p. 111-111.

- ❖ MARTINS, V. D.; LAZZARETTI, L. L.; BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. Alpha-Lipoic Acid Effect in Carbonyl and Malondialdehyde Levels in Sickle Cell Disease Patients and Sickle Cell Trait. In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007. Free Radicals in Montevideo 2007, 2007. p. 112-112.

- ❖ LAZZARETTI, L. L.; BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. S. Alpha-Lipoic Acid Effect in Antioxidants Enzymes in the Sickle Cell Disease. In: Free Radicals in Montevideo 2007, 2007. Free Radicals in Montevideo 2007, 2007. p. 113-113

- ❖ LAZZARETTI, L. L.; MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; BACCIN, A. C.; BENFATO, M. S. O efeito do ácido lipóico nos níveis de malondialdeído e carbonil nos indivíduos falciformes e traço falciforme. In: 27 Semana científica do HCPA, 2007, Porto Alegre. Revista HCPA, 2007. v. 27. p. 212-213.

- ❖ LAZZARETTI, L. L.; BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; BENFATO, M. S. Estresse Oxidativo na anemia por deficiência de ferro em indivíduos idosos. In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, XVI Feira de Iniciação Científica, II Salão UFRGS Jovem, 2007, Porto Alegre. p. 492-492.

- ❖ PEZZINI, D. A.; MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; LAZZARETTI, L. L.; BACCIN, A. C.; VEECK G. P.; BENFATO, M. S. Avaliação do efeito da qualidade da alimentação sobre parâmetros de estresse oxidativo em indivíduos traço falciforme e pacientes falciformes. In: XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007, Porto Alegre. XIX SALÃO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2007. p. 557-557.
- ❖ BACCIN, A. C.; MANFREDINI, V.; MARTINS, V. D.; LAZZARETTI, L. L.; BENFATO, M. S. Estresse oxidativo na anemia por deficiência de ferro em indivíduos idosos. In: IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007, Porto Alegre. IX Reunião Anual do PPGBCM, 2007.
- ❖ BACCIN, A. C.; LAZZARETTI, L. L.; MARTINS, V. D.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S. Dano em proteínas plasmáticas em pacientes com anemia por deficiência de ferro. In: Anais do 30º Congresso Brasileiro de Hematologia e Hemoterapia, 2007, São Paulo. Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, 2007. v. 29. p. 13-13.
- ❖ BACCIN, A. C. ; CANABARRO, I. M.; GONÇALVES, C. B. C. ; ZUFFO, L. Estudo da Utilização de Carbapenêmicos no Hospital São Vicente de Paulo. In: IX Congresso brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004, Salvador, 2004.
- ❖ BACCIN, A. C. ; OLIVEIRA, D. R.; BARBOSA, G. L. ; FLACH, I. K. ; SITTA, L. C. Impacto de um programa educacional na adesão a higienização das mãos. In: IX Congresso brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004, Salvador, 2004.
- ❖ BARBOSA, G. L.; BACCIN, A. C.; OLIVEIRA, D. R.; SCHLICHTING, D. Operação mãos limpas II - uma estratégia para aumentar a adesão à higienização. In: IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004, Salvador - BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004.
- ❖ BACCIN, A. C. ; BARBOSA, G. L.; ZUFFO, L. Perfil de Consumo da Vancomicina em um Hospital Geral Universitário. In: IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia Hospitalar, 2004, Salvador - BA. Anais do IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção e Epidemiologia hospitalar, 2004.
- ❖ BACCIN, A. C.; BARBOSA, G. L.; GONÇALVES, C. B. C.; OLIVEIRA, D. R.; FLACH, I. K.; SITTA, L. C. Avaliação do uso de vancomicina num hospital geral. In: 5º Sul Encontro de Controle de Infecção, 2003, Gramado. Anais do 5º Sul Encontro de Infecção Hospitalar, 2003.
- ❖ VANINI, S. M.; BARBOSA, G. L.; OLIVEIRA, D. R.; FLACH, I. K.; SITTA, L. C.; BACCIN, A. C. Vigilância pós-alta de infecção de sítio cirúrgico em cirurgia cardíaca. In: 5º Sul Encontro de Controle de Infecção, 2003, Gramado. Anais do 5º Sul Encontro de Infecção Hospitalar, 2003.

- ❖ ROSSI, R.; BACCIN, A. C.; BARBOSA, G. L.; TRENTIN, T.; BARELLI, C. Pesquisa de portadores de *Staphylococcus* sp em profissionais da saúde atuantes no HSVP. In: 5º Sul Encontro de Controle de Infecção, 2003, Gramado. Anais do 5º Sul Encontro de Infecção Hospitalar, 2003.
- ❖ BACCIN, A. C.; GHEDINI, C.; DIERINGS, I. C.; BARELLI, C. Avaliação da Infra-Estrutura, Condições Higiênico Sanitárias e Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle num Lactário do RS. In: X Encontro estadual de Farmacêuticos e Bioquímicos; VIII Congresso Catarinense de Farmacêuticos e Bioquímicos, II Encontro de Farmacêuticos e Bioquímicos do Mercosul, 2001, Florianópolis. Caderno de resumos dos trabalhos científicos, 2001. p. 101-101.
- ❖ DIERINGS, I. C.; BACCIN, A. C.; GHEDINI, C.; BARELLI, C. Controle microbiológico em lactário. In: XI Mostra de Iniciação Científica - III Mostra Interna de Pós-Graduação, 2001, Passo Fundo. Anais da XI Mostra de Iniciação Científica da UPF, 2001. v. 01. p. 152-152.