



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Nutrição

Juliana Omena Braga de Mendonça

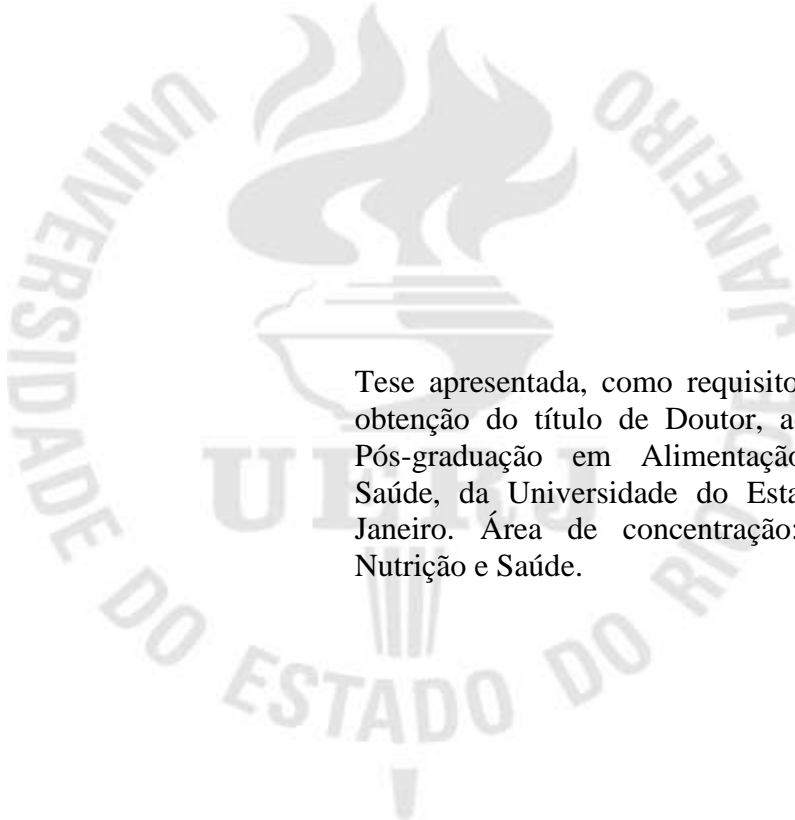
**Avaliação da Capacidade de Absorção de Ferro em Adultos com Anemia
Falciforme e de Bases para Recomendações Dietéticas a Pessoas com
Sobrecarga deste Micronutriente**

Rio de Janeiro

2020

Juliana Omena Braga de Mendonça

Avaliação da Capacidade de Absorção de Ferro em Adultos com Anemia Falciforme e de Bases para Recomendações Dietéticas a Pessoas com Sobrecarga deste Micronutriente



Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a. Marta Citelli dos Reis

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CEH/A

M539 Mendonça, Juliana Omena Braga de.
Avaliação da Capacidade de Absorção de Ferro em Adultos com Anemia Falciforme e de Bases para Recomendações Dietéticas a Pessoas com Sobrecarga deste Micronutriente / Juliana Omena Braga de Mendonça. – 2020.
140 f.

Orientador: Marta Citelli dos Reis.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição.

1. Nutrição – Teses. 2. Anemia falciforme – Teses. 3. Ferro – Metabolismo – Teses. I. Reis, Marta Citelli dos. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Nutrição. III. Título.

es

CDU 612.3

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Juliana Omena Braga de Mendonça

Avaliação da Capacidade de Absorção de Ferro em Adultos com Anemia Falciforme e de Bases para Recomendações Dietéticas a Pessoas com Sobrecarga deste Micronutriente

Tese apresentada, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Alimentação, Nutrição e Saúde.

Aprovada: 18 de dezembro de 2020.

Banca Examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Marta Citelli dos Reis (Orientadora)
Instituto de Nutrição – UERJ

Prof. Dr. Clemilson Berto Junior
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Sylvia Thomas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof^ª. Dr^ª. Cíntia Chaves Curioni
Instituto de Nutrição – UERJ

Prof^ª. Dr^ª. Flávia Fioruci Bezerra
Instituto de Nutrição - UERJ

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Ao meu avô Amauri de Oliveira Braga (*In memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar serenidade nos momentos mais difíceis e por ter iluminado meus caminhos nesta trajetória.

Aos meus pais, por todo o carinho, amor, apoio, conselhos e pela paciência em todos os momentos.

Ao meu namorado Eduardo, por toda compreensão nos momentos de dificuldades e correria, pela torcida e palavras de incentivo e, principalmente, pelo carinho e amor em todos os momentos.

À minha querida orientadora Prof.^a Dr.^a Marta Citelli dos Reis. Sem você, nada disso seria possível. Agradeço pela orientação, ensinamentos, incentivo, amizade e por todo o carinho. Você é uma grande inspiração e referência para mim!

Ao Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL) e à Prof.^a Dr.^a Cláudia Cople, pela oportunidade concedida e pela confiança. Obrigada por tudo!

Ao Instituto de Hematologia de Arthur Siqueira Cavalcanti (Hemorio) por permitir a realização da pesquisa.

À Viviane, Clarice e Valdilene, por toda a ajuda durante as coletas no LIAN e pela amizade construída.

Aos funcionários da secretaria do setor de Hematologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto e do Ambulatório de Anemias Hemolíticas do Hemorio pela colaboração sempre que foi preciso.

Ao Dr. Gustavo Federico Jauregui e ao serviço de Radiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto pela realização da ressonância magnética abdominal nos participantes.

Ao Laboratório de Desenvolvimento Analítico (LaDA) – do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro – e ao Multilab, do Instituto de Física da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, pela colaboração e realização das análises de composição isotópica do ferro.

Ao Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional (LIAN) e ao Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição, pela utilização de seus espaços.

À Prof.^a Dr.^a Cíntia Chaves Curioni, por ter aceitado ser ledora desta tese e por todas as contribuições.

Aos professores que compuseram as bancas de qualificação e defesa, pelas valiosas contribuições para a construção desta tese.

Aos professores e colegas do Programa de Pós-Graduação em Alimentação, Nutrição e Saúde da UERJ.

Às queridas amigas e companheiras de NUTRIFAL, em especial à Vanessa Voll, Jessyca Cardoso e Thamiris Souza por toda cumplicidade, incentivo e apoio durante esta caminhada.

Às também queridas Emília Delesderrier, Isabel Nascimento, Elaine Soares e Paula Normando, por toda companhia, ajuda e incentivo.

Ao Ministério da Saúde e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo financiamento deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de doutorado concedida.

A todos os participantes que concordaram em participar deste estudo, pela confiança e disponibilidade. Sem vocês este trabalho não seria possível, muito obrigada!

Os que se encantam com a prática sem a ciência são como timoneiros que entram no navio sem timão nem bússola, nunca tendo certeza do seu destino.

Leonardo da Vinci

RESUMO

MENDONÇA, Juliana Omena Braga de. *Avaliação da Capacidade de Absorção de Ferro em Adultos com Anemia Falciforme e de Bases para Recomendações Dietéticas a Pessoas com Sobrecarga deste Micronutriente*. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde). Instituto de Nutrição. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Orientações alimentares e nutricionais para doenças que cursam com a sobrecarga de ferro ainda não foram estabelecidas. A anemia falciforme (AF) é uma hemoglobinopatia que pode cursar com sobrecarga de ferro secundária a transfusões sanguíneas, sendo muito presente no Brasil, especialmente em regiões com maior concentração de pessoas de origem africana. Recentemente, estudos observaram que as concentrações de hepcidina – hormônio responsável pela homeostase de ferro e por reduzir sua absorção intestinal – eram maiores em participantes com sobrecarga de ferro se comparados àqueles sem sobrecarga e ao grupo controle. Estes dados sugerem que os indivíduos expostos à sobrecarga de ferro não precisariam reduzir a ingestão de alimentos ricos neste micronutriente, uma orientação comumente prescrita por profissionais de saúde. Todavia, estes resultados ainda não são suficientes para estabelecer uma abordagem nutricional segura, visto que aspectos como a estimativa da absorção de ferro precisam ser aprofundados. Assim, o objetivo deste estudo foi compreender as bases existentes para as recomendações dietéticas a indivíduos com sobrecarga de ferro e avaliar a absorção deste micronutriente em pessoas com anemia falciforme. Primeiramente, foi realizada uma revisão de escopo de acordo com os métodos propostos pelo Instituto Joanna Briggs e pelo protocolo do *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) a fim de sistematizar os estudos que tratam de prescrições dietéticas para pacientes com sobrecarga de ferro. Também foi realizado um estudo experimental e comparativo com 25 adultos, divididos nos grupos com AF e sobrecarga de ferro (n = 03), AF sem sobrecarga (n = 10) e indivíduos sem a doença (n = 12). A capacidade de absorção de ferro foi estimada por meio da marcação de 100 mL de suco de laranja com o isótopo estável ^{57}Fe . Amostras de sangue foram obtidas no tempo basal e 14 dias após a ingestão do isótopo, sendo a determinação da relação isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ determinada por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). Na revisão de escopo, de 6409 estudos encontrados nas bases de dados, oito foram selecionados por obedecerem ao critério de inclusão no estudo. Observou-se que embora a necessidade de restringir o ferro na dieta de indivíduos com hemocromatose seja bastante clara, há um consenso que a sobrecarga de ferro diminui a taxa de absorção. Além disso, o consumo de polifenóis e 6-shogaol reduziu a absorção de ferro ou a concentração de ferritina sérica nos participantes, enquanto as procianidinas não causaram nenhuma alteração. Embora possa ser benéfica quando feita concomitantemente à terapia de quelação, a suplementação com vitamina C deve ser evitada – assim como o consumo excessivo de álcool – por provocar reações oxidativas quando o ferro se encontra em excesso no organismo. No segundo estudo, não foram observadas diferenças nas concentrações de hepcidina sérica e na absorção de ferro entre os três grupos estudados. Diferentemente da hepcidina, parâmetros como ferritina sérica e concentração hepática de ferro se correlacionaram forte e negativamente com o percentual de ferro absorvido, apresentando-se como possíveis fatores capazes de influenciar na diminuição da absorção deste micronutriente. Analisando a comparação entre os grupos e a correlação da capacidade de absorção de ferro com estas variáveis, acredita-se que os indivíduos com AF – tanto aqueles que cursam com sobrecarga de ferro quanto os que não apresentam este quadro – não necessitem reduzir a ingestão de fontes de ferro, já que sua absorção não diferiu dos indivíduos sem a doença. No entanto, estudos adicionais que avaliem a capacidade de absorção intestinal de ferro de um número maior de indivíduos devem ser realizados para auxiliar no estabelecimento de uma conduta nutricional segura a ser adotada.

Palavras-chave: Anemia falciforme. Ferritina. Hepcidina. Metabolismo de ferro. Capacidade de absorção de ferro. Isótopo estável ^{57}Fe .

ABSTRACT

MENDONÇA, Juliana Omena Braga de. *Evaluation of Iron Absorption Capacity in Adults with Sickle Cell Anemia and Basis for Dietary Recommendations for People with Iron Overload*. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Iron overload diseases do not have yet a clear dietary approach or nutritional guidelines. Sickle cell anemia (SCA) is a hemoglobinopathy that can lead to secondary iron overload due to blood transfusions and is very common in Brazil, especially in regions with higher concentration of African descent. Recently, studies have observed that hepcidin – hormone responsible for iron homeostasis and the reduction of intestinal iron absorption – levels were higher in participants with iron overload compared to those without iron overload and control group. Those data suggested that individuals exposed to iron overload may not need to reduce the intake of iron-rich foods – a common recommendation prescribed by health professionals. However, these results are not sufficient to establish a nutritional recommendation, since aspects such as the iron absorption need to be further investigated. The aim of this study was to understand the basis for dietary recommendations for people with iron overload and to evaluate the iron absorption in adults with SCA. First, a scope review was carried out according to the methods proposed by the Joanna Briggs Institute and by the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) protocol in order to systematize the studies that support dietary prescriptions for patients with iron overload. An experimental and comparative study was also carried out with 25 adults, divided into groups with SCA and iron overload (n = 03), SCA without iron overload (n = 10) and individuals without the disease (n = 12). Iron absorption was measured using a labelled orange juice (100 mL) with ^{57}Fe stable isotope. Blood samples were collected at baseline and 14 days after isotope administration and the determination of the $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ isotopic ratio was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). In the scope review, 6409 studies were recovered from databases and eight met the inclusion criteria. Although the need to restrict iron in the diet of people with hemochromatosis is quite clear, there is a consensus that IOL diminishes its absorption. The consumption of polyphenols and 6-shogaol seems to reduce iron absorption or serum ferritin concentration, while procyanidins do not cause any changes. Although vitamin C appeared to be beneficial with concomitant iron chelation therapy, the ascorbic acid supplementation should be avoided – such as excessive alcohol consumption – not only because they increase iron absorption but because they provoke toxic oxidative reactions when iron is excessive. In the second manuscript, hepcidin levels and iron absorption did not differ between all groups studied. Unlike hepcidin, serum ferritin and hepatic iron concentration were strongly and negative correlated with the percentage of iron absorbed and seems to have a greater influence in the decrease of iron absorption. Analyzing the comparison among these groups and the correlation of iron absorption capacity and these parameters, we believe that individuals with SCA (with or without iron overload) may not need to reduce their intake of iron-rich food, maintaining their absorption similar to the individuals without the disease. Further studies evaluating the intestinal iron absorption using larger sample sizes of SCAio patients should be conducted to assist in the establishment of a safe nutrition approach to be adopted.

Keywords: Sickle cell anemia. Ferritin. Hepcidin. Iron metabolism. Iron absorption capacity. ^{57}Fe stable isotope.

RESUMEN

MENDONÇA, Juliana Omena Braga de. *Evaluación de la Capacidad de Absorción de Hierro en Adultos con Anemia Drepanocítica y de Bases para Recomendaciones Dietéticas para Personas con Sobrecarga de Hierro*. 2020. 140 f. Tese (Doutorado em Alimentação, Nutrição e Saúde). Instituto de Nutrição. Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Aún no se han establecido guías alimentarias y nutricionales para enfermedades caracterizadas por la presencia de sobrecarga de hierro. La anemia de células drepanocíticas es una hemoglobinopatía que puede conducir a una sobrecarga de hierro secundaria a transfusiones de sangre, estando presente en Brasil, especialmente en las regiones con una gran concentración de personas de origen africana. Recientemente, estudios han observado que las concentraciones de hepcidina – hormonio responsable por la homeostasis del hierro es capaz de reducir su absorción intestinal – están aumentadas en participantes con sobrecarga de hierro al compararlos con aquellos sin sobrecarga y al grupo control. Estos datos sugieren que los individuos expuestos a la sobrecarga de hierro no necesitaran reducir la ingestión de alimentos ricos en este micronutriente – una orientación comúnmente prescrita por profesionales de salud. De otra manera, estos resultados todavía no son suficientes para establecer un acercamiento al tema nutricionalmente garantizado, visto que aspectos como la estimativa de la absorción de hierro necesitan ser profundizadas. Además, es observado en la literatura que otras enfermedades que cursan con la sobrecarga de hierro no poseen orientaciones alimentares y nutricionales muy establecidas. Entonces, el objetivo de este estudio fue conocer las bases existentes para las recomendaciones dietéticas para personas con sobrecarga de hierro y evaluar la absorción de este micronutriente en personas con anemia falciforme. Primeramente, fue realizada una revisión de alcance de acuerdo con los métodos propuestos por el Instituto Joanna Briggs y por el protocolo del *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) con la finalidad de sistematizar los estudios que tratan de prescripciones dietéticas para pacientes con sobrecarga de hierro. También se realizó un estudio experimental y comparativo con 25 adultos, divididos en los grupos con anemia drepanocítica y sobrecarga de hierro (n = 03), anemia drepanocítica sin sobrecarga (n = 10) e individuos sin la enfermedad (n = 12). La capacidad de absorción de hierro fue estimada por medio de marcación de 100 mL de jugo de naranja con el isótopo estable ^{57}Fe . Muestras de sangre fueron obtenidas en el tiempo basal y 14 días después de la ingestión del isótopo, siendo la determinación de la relación isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ determinada por espectrometría de masa con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS). En la revisión del alcance, de 6409 estudios encontrados en las bases de datos, ocho fueron seleccionados por cumplir con los criterios de inclusión en el estudio. Se observó que el consumo de polifenoles y 6-shogaol redució la absorción de hierro o la concentración de ferritina sérica en los participantes, mientras que las procianidinas no causaron ningún cambio. La suplementación con vitamina C, aunque parece ser beneficiosa sólo cuando su uso es concomitante con la terapia de quelación, debe evitarse – así como el consumo excesivo de alcohol, no solo debido a la mayor absorción de hierro, sino también al causar reacciones oxidativas cuando el hierro está en exceso en el cuerpo. En el segundo artículo, no hubo diferencias en las concentraciones séricas de hepcidina y absorción de hierro entre los tres grupos estudiados. A diferencia de la hepcidina, parámetros como la ferritina sérica y la concentración de hierro hepático correlacionaron fuerte y negativamente con el porcentaje de hierro absorbido, presentándose como posibles variables capaces de influir en la disminución de la absorción de este micronutriente. Analizando la comparación entre los grupos y la correlación de la capacidad de absorción de hierro con estas variables, se cree que los individuos con anemia drepanocítica, tanto los que tienen sobrecarga de hierro como los que no tienen esta condición, no necesitan reducir su ingestión de fuentes de hierro, ya que su absorción no difiere de las personas sin la enfermedad. Sin embargo, se deben realizar más trabajos que evalúen la capacidad de absorción intestinal de hierro para ayudar a establecer un enfoque nutricional seguro que se adoptará.

Palabras clave: Anemia drepanocítica. Ferritina. Hepcidina. Metabolismo del hierro. Capacidad de absorción de hierro. Isótopo estable ^{57}Fe .

PRINCIPAIS ACHADOS

A proposta desta pesquisa surgiu a partir da necessidade de compreender a absorção de ferro em adultos com anemia falciforme. Muitas vezes estas pessoas são orientadas por profissionais de saúde a não consumirem alimentos fontes de ferro, como leguminosas, carnes e vísceras e a incluírem chás e café durante as grandes refeições (almoço e jantar) para diminuir a quantidade de ferro absorvido. No entanto, ainda não se sabe se estas práticas são realmente necessárias para estas pessoas, visto que com a retirada de alguns alimentos pode haver a diminuição da absorção de outros minerais, como o zinco.

Em contrapartida, as pessoas com anemia falciforme e com doenças que cursam com sobrecarga de ferro estão expostas às políticas públicas que têm como objetivo prevenir a anemia por deficiência de ferro, como a fortificação das farinhas de trigo e milho. Embora estas medidas sejam destinadas à população brasileira em geral, desconhece-se ainda a sua segurança para indivíduos que possam cursar com o acúmulo de ferro.

Este estudo possibilitou avaliar a absorção do ferro em pacientes com anemia falciforme com e sem sobrecarga de ferro (um quadro comum em pessoas que realizam muitas transfusões de sangue). Observou-se que a capacidade de absorver ferro não foi diferente nestes dois grupos com anemia falciforme e nem no grupo composto por pessoas sem a doença. No entanto, a alta concentração de ferro no fígado e os valores elevados de ferritina parecem atuar na diminuição do percentual de ferro absorvido. Estes achados levam a acreditar que as pessoas com anemia falciforme e sobrecarga de ferro provavelmente não necessitem restringir a ingestão de seus alimentos fonte.

Também foi observado neste trabalho que em outras doenças cujas pessoas têm um outro tipo de sobrecarga de ferro, de origem genética, o chá preto e substâncias antioxidantes podem ajudar na diminuição da absorção deste mineral e que o consumo de álcool e vitamina C devem ser evitados.

Estes resultados contribuem para que possamos melhorar o acompanhamento nutricional das pessoas com anemia falciforme e também abrem caminho para que novos estudos sejam desenvolvidos a respeito do tema.

LISTA DE SÍMBOLOS

^{54}Fe	isótopo estável de ferro-54
^{55}Fe	isótopo radioativo de ferro-55
^{56}Fe	isótopo estável de ferro-56
^{57}Fe	isótopo estável de ferro-57
^{58}Fe	isótopo estável de ferro-58
^{59}Fe	isótopo radioativo de ferro-59
^{60}Ni	isótopo estável de níquel-60
α	alfa
γ	gama
%	porcentagem
\pm	mais ou menos
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius
μc	microcoulumb
μCi	microcurie
μL	microlitro
$\mu\text{g/dL}$	micrograma por decilitro
$\mu\text{mol/g}$	micromol por grama
Ca^{2+}	íon cálcio
Cl^{-}	íon cloro
Fe^{2+}	ferro no estado ferroso
Fe^{3+}	ferro no estado férrico
g	grama
g/dL	grama por decilitro
g/L	Grama por litro
K^{+}	potássio
kg	quilograma
kg/m^2	quilograma por metro quadrado
L min^{-1}	litro por minuto
mg	miligrama
mg/dL	miligrama por decilitro
mg/g	miligrama por grama

mg/mmol	miligrama por milimol
mL	mililitro
mL/kg	mililitro por quilograma
mL min ⁻¹	mililitro por minuto
ng/dL	nanograma por decilitro
ng/mL	nanograma por mililitro
ppm	partes por milhão
pg/mL	picograma por mililitro
W	Watts

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Ação da hepcidina no metabolismo de ferro	36
Figura 2 - Fluxograma do protocolo de estudo	54
Figura 3 – Relação entre as abundâncias de $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ em uma amostra de hemácias, normalizada pelas massas.....	56
Quadro 1 – Parâmetros utilizados no ICP-MS para a determinação da relação isotópica	58
Figura 4 – Diagrama esquemático do ICP-MS.....	58
Quadro 2 – Valores de referência do Índice de Massa Corporal (IMC) propostos pela Organização Mundial de Saúde.....	62
Artigo 1	
Figura 1 – Pathophysiological classification of iron overload (IOL).....	66
Figure 2 – Flow diagram of the literature search process.....	68
Artigo 2	
Figure 1 – Flow chart of participants.....	91
Figure 2 – Ferritin, hepcidin and iron absorption values of control group, SCAw and SCAio patients.....	94
Figure 3 – Spearman’s correlations analysis between ferritin, LIC, hepcidin and iron absorption values between groups.....	96

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

Table 1 – PCC criteria for the inclusion or exclusion of studies	67
Table 2 – Study Characteristics	69
Table S1 – Search strategy conducted on Medline via Ovid.	83

Artigo 2

Table 1 – Frequency of general characteristics of control group and SCA patients.	91
Table 2 – Comparison of laboratorial parameters between the control group and SCA patients.	92
Table 3 – Comparison of laboratorial parameters between control group, SCAw and SCAio patients.	93
Table 4 – Iron absorption, liver iron concentration (LIC), serum ferritin and hepcidin concentrations of control group, SCAw and SCAio patients.	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	anemia falciforme
ANOVA	análise de variância (<i>analysis of variance</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AVC	acidente vascular cerebral
BMP	proteína morfogenética óssea (<i>bone morphogenic protein</i>)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CGAN	Coordenação Geral de Alimentação e Nutrição
CGSH	Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DAB	Departamento de Atenção Básica
DAET	Departamento de Atenção Especializada e Temática
Dcytb	redutase citocromo b duodenal (<i>duodenal cytochrome B</i>)
DECIT	Departamento de Ciência e Tecnologia
DF	doença falciforme
DMT-1	transportador de metal divalente 1 (<i>divalent metal transporter 1</i>)
DNA	ácido desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>)
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético (<i>ethylenediamine tetraacetic acid</i>)
ERFE	eritroferrona (<i>Erythroferrone</i>)
EROs	espécies reativas de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPN	ferroportina
GDF-15	fator de diferenciação e crescimento 15 (<i>growth differentiation factor 15</i>)
HAMP	peptídeo antimicrobiano da hepcidina (<i>hepcidin antimicrobial peptide</i>)
Hb A	hemoglobina normal do adulto
Hb AS	hemoglobina dos portadores de traço falciforme
Hb F	hemoglobina fetal
Hb S	hemoglobina S
Hb SS	hemoglobina dos portadores de anemia falciforme
Hemorio	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HFE	gene que codifica a proteína HFE (<i>High Fe</i>)
HH	hemocromatose hereditária
HIF	fatores induzidos por hipóxia (<i>hypoxia-inducible factors</i>)
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto

IAEA	Agência Internacional de Energia Atômica (<i>International Atomic Energy Agency</i>)
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1 (<i>intercellular adhesion molecule 1</i>)
ICP-MS	espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
IL-6	interleucina-6
IMC	índice de massa corporal
IRE	elementos responsivos ao ferro (<i>iron response element</i>)
IRP	proteína reguladora de ferro (<i>iron regulatory protein</i>)
LaDA	Laboratório de Desenvolvimento Analítico
LDH	lactato desidrogenase
LIAN	Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional
LIC	concentração hepática de ferro (<i>liver iron concentration</i>)
MEDLINE	Sistema Online de Busca e Análise de Literatura Médica (<i>Medical Literature Analysis and Retrieval System Online</i>)
MS	Ministério da Saúde
NTBI	ferro não ligado à transferrina (<i>non-transferrin bound iron</i>)
NUTRIFAL	Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	proteína C reativa
PNSF	Programa Nacional de Suplementação de Ferro
PRISMA	<i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses</i>
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RNA _m	RNA mensageiro
SAS	Secretaria de Atenção à Saúde
SCTIE	Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos
SMAD	proteína homóloga decapentaplégica (<i>small mothers against decapentaplegic</i>)
STOP	Estudo de Prevenção de AVC na Anemia Falciforme (<i>Stroke Prevential Trial in Sickle Cell Anemia</i>)
sTfR	receptor solúvel de transferrina (<i>soluble transferrin receptor</i>)
Tf	transferrina
TfR	receptor de transferrina (<i>transferrin receptor</i>)
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UL	limite superior tolerável de ingestão (<i>tolerable upper intake level</i>)
VCAM-1	proteína de adesão vascular-1 (<i>vascular cell adhesion protein 1</i>)

SUMÁRIO

	APRESENTAÇÃO	20
	INTRODUÇÃO	22
1	REVISÃO DA LITERATURA	24
1.1	Doença Falciforme	24
1.1.1	<u>Fisiopatologia e quadro clínico da doença</u>	24
1.1.2	<u>Tratamento</u>	27
1.1.1.1	Sobrecarga de ferro: toxicidade e tratamento.....	29
1.2	Metabolismo do Ferro	31
1.2.1	<u>Absorção e transporte de ferro</u>	32
1.2.2	<u>Homeostase do ferro</u>	34
1.2.3	<u>Papel desempenhado pela hepcidina na doença falciforme</u>	36
1.2.4	<u>Parâmetros de mensuração do ferro</u>	38
1.3	Nutrição na doença falciforme e em doenças que cursam com sobrecarga de ferro: Restrição de ferro dietético e políticas públicas de controle da anemia ferropriva	40
1.4	Testes de absorção de ferro	42
1.4.1	<u>Radioisótopos</u>	43
1.4.2	<u>Isótopos estáveis</u>	45
2	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	49
3	OBJETIVOS	50
3.1	Objetivo Geral	50
3.2	Objetivos Específicos	50
4	MÉTODOS	51
4.1	Desenho do estudo	51
4.2	Aspectos éticos	51
4.3	Métodos do estudo	51
4.3.1	<u>Revisão de escopo</u>	51
4.3.2	<u>Capacidade de absorção intestinal de ferro</u>	52
4.3.2.1	População do estudo.....	52
4.3.2.2	Etapas do estudo.....	53
4.3.2.3	Análises Laboratoriais.....	54
4.3.2.4	Dose utilizada do isótopo ⁵⁷ Fe	55

4.3.2.4.1	Preparo do sulfato ferroso isotopicamente marcado com ^{57}Fe	56
4.3.2.4.2	Administração do isótopo	57
4.3.2.4.3	Determinação da relação isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)	57
4.3.2.4.4	Determinação da incorporação de ferro nas hemácias e de sua absorção	60
4.3.2.4	Ficha clínica da pesquisa	61
4.3.2.5	Ressonância Magnética	62
4.4	Análise estatística	63
4.5	Financiamento	63
5	RESULTADOS	64
5.1	ARTIGO 1: The effect of food and nutrients on iron overload: what do we know so far?	64
5.1.1	<u>Introduction</u>	65
5.1.2	<u>Methods</u>	66
5.1.3	<u>Strategy for search and selection of studies</u>	67
5.1.4	<u>Selection of studies and extraction of data</u>	67
5.1.5	<u>Types of studies</u>	67
5.1.6	<u>Results</u>	68
5.1.6.1	Iron	72
5.1.6.2	Vitamin C	73
5.1.6.3	Other Antioxidants	73
5.1.6.4	Alcohol	74
5.1.7	<u>Discussion</u>	75
5.1.7	<u>Conclusion</u>	77
5.1.8	<u>References</u>	78
5.2	ARTIGO 2: Iron Absorption in Adults with Sickle Cell Anemia	84
5.2.1	<u>Introduction</u>	85
5.2.2	<u>Methods</u>	86
5.2.2.1	Study Participants	86
5.2.2.2	Study Design	87
5.2.2.3	Iron isotope analysis	88
5.2.2.4	Calculation ^{57}Fe incorporation into red blood cells and estimation of iron absorption	88
5.2.2.4	Assessment of Hematological and Biochemical Analysis	89

5.2.2.5	Assessment of liver iron concentration (LIC)	89
5.2.2.6	Anthropometry and Nutritional Assessment	90
5.2.2.7	Statistical Analysis.....	90
5.2.3	<u>Results</u>	90
5.2.4	<u>Discussion</u>	96
5.2.5	<u>Conclusion</u>	98
5.2.6	<u>References</u>	98
	REFERÊNCIAS	103
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Participantes oriundos do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio)	120
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para os Participantes sem a Doença Falciforme.....	122
	APÊNDICE C – Ficha Clínica da Pesquisa de Participantes com a Doença Falciforme.....	124
	APÊNDICE D – Ficha Clínica da Pesquisa de Participantes sem a Doença Falciforme.....	127
	ANEXO A – Ofício da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde do Brasil manifestando interesse na realização da pesquisa.....	130
	ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto.....	132
	ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio)	135
	ANEXO D – Alterações propostas pelos revisores da revista European Journal of Clinical Nutrition.....	138

APRESENTAÇÃO

A presente tese faz parte do estudo “Avaliação do Risco de Sobrecarga de Ferro por Fontes Alimentares, Suplementação Medicamentosa Profilática e/ou Fortificação com Micronutrientes em Pó em Pessoas com Anemia Falciforme”, que obteve financiamento a partir da Chamada Pública do CNPq/MS/SCTIE/DECIT/SAS/DAB/ CGAN, de número 13/2017.

No ano de 2016, a Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde – por meio do Ofício número 345/2016/CGSH/DAET/SAS/MS – demonstrou interesse nos resultados da pesquisa “Alterações no metabolismo de ferro em pessoas com doença falciforme”, originada da minha dissertação de mestrado e conduzida pelo Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL). Neste estudo, observou-se que pessoas com anemia falciforme que cursavam com sobrecarga de ferro possuíam maiores concentrações de hepcidina (hormônio regulador do metabolismo de ferro), o que em tese seria capaz de diminuir a absorção intestinal deste micronutriente. Entretanto, estes dados eram insuficientes para garantir que estes indivíduos consumissem de forma segura os alimentos ricos em ferro, bem como as farinhas de milho e trigo fortificadas – políticas mandatórias no Brasil, discutidas mais à frente neste trabalho – sendo necessário o desenvolvimento de testes de absorção de ferro.

Assim, com o financiamento obtido por meio da Chamada Pública no final de 2017, a partir de 2018 foram realizados os testes de absorção de ferro, com o uso do isótopo estável ⁵⁷Fe, e análises laboratoriais a fim de responder esta demanda científica e do Ministério da Saúde. Espera-se que os conhecimentos advindos deste projeto possam trazer subsídios para a reformulação da Política Nacional de Fortificação de Farinhas de Trigo e Milho, bem como a criação de protocolos nutricionais voltados a estas pessoas.

Destaca-se que ao longo do desenvolvimento desta tese, durante a etapa de coleta de dados para avaliação da capacidade de absorção de ferro, o estudo foi interrompido devido à ocorrência da pandemia de COVID-19. Desta forma, somente a partir de setembro de 2020 os dados voltaram a ser coletados, restringindo-se aos participantes do grupo controle devido à susceptibilidade à infecção pelo coronavírus a que os pacientes com a doença falciforme estão sujeitos.

Este documento está estruturado nas seguintes seções: introdução; revisão da literatura; justificativa; objetivos; métodos; resultados e discussão; e conclusões. A seção “Resultados e Discussão” foi desenvolvida no formato de dois artigos científicos. O primeiro,

intitulado “*Food and nutrients effects on iron overload: what do we know so far?*”, foi submetido para o periódico “European Journal of Clinical Nutrition” em 05 de outubro de 2020. O segundo, intitulado “*Iron absorption in adults with sickle cell anemia*” será submetido em breve para periódico de circulação internacional.

INTRODUÇÃO

A doença falciforme (DF) é uma doença geneticamente determinada, caracterizada como uma hemoglobinopatia em que há a formação da hemoglobina S (Hb S, por ter o formato de foice, origina da palavra em inglês “*sickle*”), e que cursa com eventos vaso-oclusivos, hemolíticos e complicações sistêmicas crônicas. Sua gravidade varia entre os indivíduos, que podem apresentar desde casos praticamente assintomáticos até formas graves.

Estima-se que a cada ano cerca de 275.000 nascidos-vivos tenham DF (MODELL; DARLISON, 2008) e que até 2050 este número chegue a 400.000 (PIEL et al., 2013). A incidência da doença varia entre diferentes regiões e etnias (FEUCHTBAUM et al., 2012). Nos Estados Unidos, 1 a cada 360 dos afro-americanos recém-nascidos possui DF (KATO et al., 2018), porém alterações demográficas resultaram na maior prevalência da doença nas populações constituídas por imigrantes; em Nova Iorque, por exemplo, grande parte das crianças nascidas com esta hemoglobinopatia entre os anos de 2000 e 2008 eram filhas de mulheres que haviam imigrado para o país (WANG et al., 2013).

No Brasil, a DF constitui-se como a doença hereditária de maior prevalência no país e também apresenta uma variação entre os Estados, distribuindo-se de forma heterogênea, com maior frequência em locais em que há grande proporção de descendentes negros na população, como Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais (ZAGO, 2001). Dados dos Programas Estaduais de Triagem Neonatal mostra uma alta incidência de traço falciforme e também da DF em estados como o Rio de Janeiro (1 a cada 20 nascidos vivos com traço falciforme e 1 a cada 1300 diagnosticados com DF) e Bahia (1 a cada 17 nascidos vivos com traço falciforme e 1 a cada 650 diagnosticados com DF) (BRASIL, 2014). Estima-se que, atualmente, cerca de 30.000 pessoas em todo país tenham a referida hemoglobinopatia (KATO et al., 2018).

Embora os números da DF sejam expressivos em um país de dimensões continentais como o Brasil, por muito tempo houve uma invisibilidade da doença no que diz respeito às políticas públicas, aproximando-se da situação de doenças negligenciadas (FERREIRA; CORDEIRO, 2013; BARSAGLINI; PAZ; LEMOS, 2015). Em 16 de agosto de 2005 foi publicada a Portaria de nº 1391, instituindo a Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme e outras Hemoglobinopatias, que tem por objetivo reduzir a morbimortalidade da doença no Brasil e trazer qualidade de vida a todos estes indivíduos (BRASIL, 2005), dando assim maior visibilidade à doença. No entanto, apesar destes esforços para que as políticas públicas voltadas para a atenção da DF sejam empregadas em larga escala no nosso país, percebe-se que esta hemoglobinopatia ainda é desconhecida por grande

parte da população, e também é um assunto pouco debatido no meio acadêmico e científico. Em 11 de abril de 2019, por meio do decreto 9.759/2019, o Ministério da Saúde extinguiu a Comissão de Assessoramento Técnico em Doença Falciforme, composta por especialistas, gestores, acadêmicos e representantes de pessoas com doença falciforme. Esta comissão contribuiu de forma decisiva para a implementação da referida política no Brasil, retirando a DF de sua completa invisibilidade e fazendo o enfrentamento ao racismo estrutural que promove esta invisibilidade.

Visando compreender como a DF e seus desdobramentos podem impactar a nutrição dos indivíduos com a doença – e também como esta área pode ajudar a diminuir algumas intercorrências desta hemoglobinopatia e contribuir para o aumento da qualidade de vida destas pessoas – foi criado em 2010, o Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL), uma parceria entre o Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) com o Ministério da Saúde. O NUTRIFAL tem como objetivo definir as principais demandas nutricionais das pessoas com DF, a fim de aprimorar o cuidado nutricional a estes indivíduos, implementar pesquisas na área de nutrição e elaborar diretrizes voltadas para este grupo.

A sobrecarga de ferro na DF é um tema de grande relevância no quadro clínico da doença, mas pouco abordado na nutrição. O grande número de transfusões sanguíneas realizadas pelos indivíduos com a doença pode levar ao aumento da concentração de ferro corporal (JOSEPHSON et al., 2007). No entanto, pouco se sabe a respeito da contribuição da ingestão do ferro dietético no desenvolvimento desta condição. Em outras hemoglobinopatias, como a beta-talassemia, é sabido que há o aumento da absorção intestinal do ferro proveniente da dieta (NEMETH, 2010); já na DF, os poucos estudos a respeito do tema apresentam lacunas sobre o real impacto do ferro dietético nesta enfermidade.

Desta forma, o presente estudo pretende contribuir para o conhecimento da absorção do ferro na DF, em especial em indivíduos com anemia falciforme. Embora o aumento da hepcidina – hormônio regulador da homeostase de ferro – nos indivíduos com DF e sobrecarga de ferro já tenha sido documentado, indicando uma possível diminuição da absorção intestinal deste micronutriente, aspectos como a estimativa da capacidade de absorção de ferro precisam ser aprofundados para elucidar as lacunas existentes no conhecimento sobre o seu metabolismo e, futuramente, auxiliar na criação de protocolos e diretrizes que norteiem a conduta nutricional voltada a estas pessoas.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Doença Falciforme

A DF é uma hemoglobinopatia hereditária, caracterizada pela alteração na conformação da hemoglobina normal (Hb A) e pela formação da hemoglobina S (Hb S). O surgimento desta hemoglobina anormal é resultante da troca de uma adenina por uma timina (GAG → GTG) no sexto códon do gene da β-globina, localizado no cromossomo 11, provocando a substituição do ácido glutâmico pela valina (CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009).

Este acontecimento é capaz de provocar grandes alterações nas propriedades físico-químicas da hemoglobina em seu estado desoxigenado, culminando na falcização – mudança da forma normal da hemácia, de uma célula bicôncava e flexível, para a forma de foice, que a torna mais rígida; como resultado, há a alteração da reologia dos glóbulos vermelhos e da membrana eritrocitária (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010). O processo de falcização resulta no encurtamento da vida média e na ocorrência de fenômenos de vaso-oclusão, episódios de dor e lesão de órgãos, dentre outros (BALLAS, 2002).

O termo “anemia falciforme” (AF) é utilizado apenas para a forma da doença na qual a Hb S apresenta-se em homozigose (genótipo Hb SS). A forma mais comum de herança genética da doença se deve ao provimento de apenas um dos alelos do gene anormal por um dos genitores, produzindo Hb A e Hb S, conhecido como traço falciforme (Hb AS), uma condição assintomática. Quando ambos transmitem um alelo anormal do gene, a criança apresenta a AF (Hb SS) (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010).

Além de se apresentar em homozigose, o gene da hemoglobina S também pode combinar-se com outras anomalias hereditárias, como as hemoglobinas C, D e beta-talassemia, dentre outros, dando origem às hemoglobinopatias SC, SD e Sβ-talassemia, respectivamente (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002).

1.1.1 Fisiopatologia e quadro clínico da doença

As alterações fisiopatológicas ocorridas na DF e que afetam a hemoglobina são originadas pela formação de longos polímeros de Hb S, organizados em filamentos paralelos, formando feixes de polímeros que modificam a arquitetura e flexibilidade da hemácia. Além

disso, outra consequência desta polimerização é a desidratação das células, já que há o aumento da concentração dos íons de cálcio (Ca^{2+}) no citosol, ativando o Canal de Gardos (canal de transporte de íons potássio - K^+) e da ativação excessiva do canal de transporte dos íons potássio e cloro (K^+Cl^-), estimulados por edema e por acidificação celular (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010; ODIÈVRE et al., 2011).

Devido a estas modificações, as hemácias falcizadas tendem a se aglomerar nos vasos sanguíneos, levando à obstrução na microcirculação, denominada como vaso-oclusão. Consequentemente, há o impedimento da oxigenação adequada a algumas partes do corpo (ODIÈVRE et al., 2011) além da ativação e migração de neutrófilos para o local acometido, favorecendo a adesão destas células ao endotélio vascular e formando um ambiente pró-inflamatório nesta microvasculatura. Há ainda na DF, a depleção do óxido nítrico — importante vasodilatador que age inibindo a ativação plaquetária e a adesão de moléculas — o que pode contribuir para a vasoconstrição e levar também à ativação da inflamação (ZENNADI et al., 2008; BUNN et al., 2010).

Com processos vaso-oclusivos ocorridos de forma repetida no baço, as pessoas com DF podem ter em alguns casos sua função esplênica diminuída, culminando em um fenômeno denominado asplenia funcional. Os numerosos infartos podem levar à fibrose e desaparecimento anatômico do baço nos primeiros 5 anos de vida. Sua principal consequência é a redução significativa da capacidade imunológica de combater infecções (ZAGO; PINTO, 2007). Além disso, a asplenia funcional causa um importante impacto na reciclagem do ferro (GRÜNEWALD, 2015).

Embora a vaso-oclusão apresente-se como o quadro central da DF, os indivíduos com esta hemoglobinopatia também podem apresentar uma hemólise crônica, com a redução da sobrevivência das hemácias, de 120 dias – vida média de uma hemácia normal – para cerca de 10 a 20 dias (RHEA; MOLINARO, 2014). Devido ao encurtamento da meia vida destas hemácias, as pessoas com DF apresentam uma anemia hemolítica crônica, caracterizada pelo aumento de reticulócitos, elevação da bilirrubina e presença de icterícia (KATO et al., 2006).

Acredita-se que a hemólise ocorre principalmente de forma extravascular, via fagocitose por macrófagos, mas uma fração substancial, de aproximadamente um terço, parece ocorrer por meio da hemólise intravascular (KATO et al., 2018).

O processo de envelhecimento das hemácias está relacionado com a exposição às espécies reativas de oxigênio (EROs), que promovem a oxidação de moléculas e modulação da atividade de fatores de transcrição e canais de membranas (LEONARD; HARRIS; SHI, 2004). A grande exposição às EROs é capaz de gerar a ativação da caspase-3, que afeta as

proteínas citosólicas e do citoesqueleto das hemácias (MANDAL et al., 2003). O comprometimento da membrana celular é acompanhado pela exposição de fosfatidilserina em sua superfície, culminando na retirada destas hemácias da corrente sanguínea pelos macrófagos (MANDAL et al., 2005), em um processo conhecido como eriptose – a morte programada de hemácias (LANG; LANG, 2015).

A hemólise intravascular também tem seu processo relacionado ao aumento do estresse oxidativo que ocorre na DF (ALAYASH, 2017) e a liberação do conteúdo intracelular da hemácia – hemoglobina, ferro e heme – contribui para aumentar o processo de dano oxidativo (VOSKOU et al., 2015). Ao sofrer oxidação, a hemoglobina libera no plasma o heme, que liga-se à hemopexina: em condições normais, esse complexo é removido da circulação pelos macrófagos, onde serão degradados; porém, em quadros de hemólise intravascular exacerbada, os mecanismos protetores tornam-se sobrecarregados (ROTHER et al., 2005), gerando acúmulo de hemoglobina livre e heme no plasma, levando a danos vasculares, esplênicos e hepáticos (SCHAER et al., 2013).

A gravidade clínica da DF apresenta-se de forma variável: enquanto alguns pacientes convivem com uma condição branda da doença, outros manifestam quadros graves, com diversas intercorrências e hospitalizações frequentes. Fatores hereditários e adquiridos contribuem para a variabilidade clínica da DF. A severidade clínica, associada ao grau de anemia, pode depender do genótipo – sendo considerado geralmente mais grave quando há homozigose da Hb S (BALLAS et al., 2010). A associação dos haplótipos dos genes β da hemoglobina com a gravidade da doença também é discutida. Observou-se que haplótipos como Senegal e Árabe-Indiano parecem estar associados a formas mais brandas da doença, enquanto o haplótipo Bantu tende a apresentar um curso da doença mais severo (STEINBERG, 2005). No entanto, há tantas variações fenotípicas entre indivíduos com um haplótipo em comum que essa hipótese não se confirmou e, portanto, parece que os haplótipos não devem ser utilizados como preditores da gravidade da doença (GABRIEL; PRZYBYLSKI, 2010). Em relação aos fatores adquiridos, o nível socioeconômico, variações na qualidade da alimentação, acesso à assistência médica e até mesmo fatores climáticos (como temperatura, umidade, qualidade do ar e altitude) contribuem para a gravidade da evolução clínica (BRASIL, 2002a; TEWARI et al., 2015).

As pessoas com DF convivem continuamente com a dor, uma característica padrão da doença e que geralmente domina o quadro clínico ao longo da vida, acometendo a região lombar, tórax, membros e extremidades. Sua intensidade é variável, podendo ocorrer desde episódios transitórios até mesmo crises que perduram por dias ou semanas e que demandam o

acesso a serviços de pronto-atendimento e à internação hospitalar (BALLAS; GUPTA; ADAMS-GRAVES, 2012).

Há um amplo espectro de complicações clínicas na DF que podem comprometer a qualidade de vida dos indivíduos com a doença – como as úlceras de perna, necrose óssea, retinopatia e cálculos biliares – ou até comprometer diretamente órgãos vitais, consequentemente levando ao risco de morte, como infecções, complicações cardiorrespiratórias e esplênicas, insuficiência renal e acidente vascular cerebral (AVC) (ZAGO; PINTO, 2007). Em relação especificamente ao AVC, é importante ressaltar que esta é uma das mais graves complicações que ocorrem, atingindo 7-13% das crianças com DF (MAZUMDAR et al., 2007) e até 25% dos indivíduos com AF, sendo a principal causa de morbidade (OHENE-FREMPONG et al., 1998).

Outra importante causa de grande morbidade e mortalidade na DF é o sequestro esplênico, desencadeado muitas vezes por infecções banais ou causas desconhecidas, no qual o baço retém um grande volume de hemácias em algumas horas, provocando uma rápida diminuição da concentração de hemoglobina, podendo levar ao choque hipovolêmico e morte (ZAGO; PINTO, 2007).

1.1.2 Tratamento

A abordagem geralmente adotada na DF engloba medidas preventivas e gerais, tendo por objetivo preservar a saúde dos indivíduos e diminuir as intercorrências da doença, como as crises de falcização e as agudizações da anemia crônica, dentre outros eventos clínicos. De forma paliativa, algumas das ações realizadas na doença são: aconselhamento à ingestão hídrica adequada, boa nutrição e realização de exames de rotina (BALLAS, 2002; BRASIL, 2002a).

No Brasil, a partir de 1995 a hidroxiureia tornou-se o primeiro fármaco utilizado para a prevenção de complicações decorrentes da doença (BRASIL, 2002a). Este medicamento é capaz de induzir a produção da hemoglobina fetal (Hb F), uma hemoglobina formada por duas cadeias alfa e duas cadeias gama ($\alpha_2\gamma_2$) e que inibe a polimerização da Hb S devido à sua alta afinidade com o oxigênio, se comparada à Hb A (COLEMAN; INUSA, 2007). Portanto, o aumento de Hb F leva à redução do processo de falcização das hemácias, da hemólise e das crises vaso-oclusivas (WARE; AYGUN, 2009; TELEN, 2016). Além do aumento na síntese de Hb F, a hidroxiureia também reduz o número de glóbulos brancos e plaquetas, reduzindo

potencialmente seus papéis na adesão vascular, diminui a vasoconstrição e trombose, além de reduzir a hemólise e os danos à membrana eritrocitária (PLATT, 2008; WARE, 2010).

Devido ao grande número de hemácias produzidas em decorrência da hemólise característica da doença, as reservas de ácido fólico em pessoas com DF geralmente encontram-se depletadas. Assim, a suplementação com esta vitamina faz-se necessária (NDEFO et al., 2008).

Em 2019, um novo medicamento denominado voxelotor (GBT440) foi aprovado nos Estados Unidos pela agência reguladora FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*) para o tratamento de adolescentes e adultos com doença falciforme. Ele é capaz de modular a hemoglobina, aumentando sua afinidade ao oxigênio e, conseqüentemente, reduzindo a polimerização e falcização das hemácias (HUTCHALEELAHA et al., 2019; BLAIR, 2020). No entanto, este medicamento ainda não está disponível no Brasil.

As transfusões sanguíneas também são necessárias no tratamento e prevenção de algumas complicações da doença, podendo ser intermitentes ou crônicas. Transfusões intermitentes (também denominadas de esporádicas) são aquelas administradas geralmente em quadros agudos, sendo empregadas no intuito de melhorar a capacidade do transporte de oxigênio do sangue e diminuir a hemólise, como por exemplo, em episódios de síndrome torácica aguda, em crises de sequestro esplênico ou no período pré-operatório (JOSEPHSON et al., 2007; REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2010); já as transfusões crônicas/regulares são realizadas de forma programada, com o objetivo de prevenir complicações graves ou a progressão da doença (HARMATZ et al., 2000), como na hipertensão pulmonar, insuficiência renal crônica e na prevenção de AVC – primário ou recorrente –, por meio da diminuição da Hb S a < 30% da hemoglobina total circulante no sangue (PEGELOW et al., 1995; BALLAS, 2002; JOSEPHSON et al., 2007).

A importância da realização de transfusões crônicas foi observada inicialmente no Estudo de Prevenção de AVC na Anemia Falciforme (*STOP 1*, do inglês *Stroke Prevention Trial in Sickle Cell Anemia*), em que Adams e colaboradores (1998) observaram que a regularidade da transfusão sanguínea reduziu em 92% o risco de AVC em crianças. Em 2005, no estudo subsequente *STOP 2* (ADAMS E BRAMBILLA, 2005), constatou-se que a descontinuação destas transfusões resultou em risco elevado para AVC, enquanto que nas crianças que participaram do grupo com transfusões regulares, nenhum evento isquêmico foi registrado.

Embora a transfusão sanguínea ofereça benefícios ao quadro clínico da DF, a sua realização de forma regular pode conduzir à sobrecarga de ferro, visto que cada unidade de

sangue transfundido contém aproximadamente 200-250 mg deste mineral (INATI; KHORIATY; MUSSALAM, 2011). Em indivíduos saudáveis, o ferro encontra-se no organismo em quantidades constantes, ao redor de 4g (GANZ, 2007), enquanto em pessoas que realizam a terapia de transfusão de forma rotineira observa-se o armazenamento de 5-10 g/ferro ao ano (HOFFBRAND; TAHER; CAPPELLINI, 2012).

Ainda não existem dados na literatura a respeito da prevalência da sobrecarga de ferro em pessoas com AF no Brasil. Contudo, é importante salientar que embora os indivíduos que realizam transfusões crônicas estejam mais propensos à sobrecarga de ferro, aqueles que foram hospitalizados em diversos momentos ao longo da vida e que necessitaram de transfusões em quadros agudos esporádicos também podem apresentar uma carga excessiva deste mineral. Em muitos casos, esta sobrecarga não é reconhecida e, conseqüentemente, não tratada (BALLAS, 2001). Assim, devido à incerteza do histórico transfusional dos pacientes com DF, deve-se avaliar as concentrações de ferritina sérica para identificar a presença da sobrecarga de ferro (COATES; WOOD, 2017).

1.1.1.1 Sobrecarga de ferro: toxicidade e tratamento

Além da DF, outras doenças podem cursar com quadros de sobrecarga de ferro, sendo eles primários ou secundários.

A sobrecarga primária ocorre devido ao processo de regulação da homeostasia de ferro, como na hemocromatose hereditária (HH), uma doença genética caracterizada pelo aumento de absorção intestinal de ferro e seu posterior acúmulo em diferentes órgãos (BRANDHAGEN; FAIRBANKS; BALDUS, 2002; FOWLER, 2008). A mutação mais comumente encontrada nesta patologia é a do gene regulador da homeostase de ferro, conhecido como HFE (do inglês “*High Fe*”) e localizado no cromossomo 6, porém mutações associadas ao receptor 2 da transferrina, à hepcidina e a hemojuvelina também podem ser encontradas (POWELL; SECKINGTON; DEUGNIER, 2016).

Já no caso da sobrecarga secundária, nota-se o acúmulo de ferro em doenças que cursam com uma eritropoiese inadequada e que requerem como tratamento a realização de transfusões sanguíneas, como é o caso da própria DF, além de doenças como a talassemia, síndrome mielodisplásica, dentre outras (GATTERMAN, 2009).

Os sintomas e sinais clínicos da sobrecarga são variáveis e dependem da quantidade de ferro em excesso e também do tempo de exposição ao qual o organismo foi submetido a este

mineral, e no que se refere especificamente à DF, quanto maior a frequência de transfusão do paciente maiores são suas chances de apresentar a sobrecarga de ferro (INATI et al., 2010).

Inicialmente, referem-se como sintomas a fadiga, artrite e dores abdominais, enquanto os sinais clínicos relacionados a este fenômeno podem variar desde hepatoesplenomegalia, fibrose portal até a cirrose hepática e, conseqüentemente, pode levar à insuficiência hepática (OLIVIERI, 2001; DARBARI et al., 2006). Embora ainda seja pouco relatado em indivíduos com DF, o comprometimento cardíaco aparece também como uma das complicações decorrentes da carga excessiva de ferro (MELONI et al., 2014). Darbari et al. (2006) observaram que a sobrecarga de ferro e suas conseqüências apresentaram-se como umas das principais causas de morte na DF, ao lado de eventos como pneumonia, síndrome torácica aguda e insuficiência renal.

Com a progressão deste quadro, o ferro torna-se potencialmente tóxico, dado à sua tendência de catalisar a formação de EROs – como o peróxido de hidrogênio e o íon superóxido – que, quando aumentadas, podem levar ao estresse oxidativo, com a oxidação de proteínas e lipídeos e, conseqüentemente, danos celulares (WARD, 2010). O excesso destas espécies reativas também é capaz de aumentar a adesão das hemácias ao endotélio em virtude da maior expressão de moléculas de adesão, como, proteína de adesão vascular-1 (VCAM-1, do inglês *vascular cell adhesion protein 1*), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1, do inglês *intercellular adhesion molecule 1*) e E-selectina na superfície celular, bem como a produção de citocinas pró-inflamatórias (SULTANA et al, 1998; CONRAN; FRANCO-PENTEADO; COSTA, 2009). Há também uma maior expressão de moléculas de adesão na hemácia, como é o caso da fosfatidilserina, encontrada em maior quantidade na parte interna da membrana celular em hemácias normais, mas que em células falciformes se apresenta exposta na superfície. Estudos observaram que as hemácias com maior exposição de fosfatidilserina têm o potencial de adesão celular três vezes maior se comparadas àquelas normais (HEBBEL, 1997; ZAGO; PINTO, 2007).

Na sobrecarga primária, as diretrizes internacionais concordam que o excesso de ferro deve ser tratado com a flebotomia, também chamadas de sangria terapêutica, da forma mais precoce possível, assim que as concentrações de ferritina sérica apresentarem-se acima do limite superior dos valores de referência. Este tratamento visa a diminuição do estoque de ferro corporal e a prevenção de lesões em órgãos em decorrência da sobrecarga (ADAMS; BRISSOT; POWELL, 2000; POWELL; SECKINGTON; DEUGNIER, 2016).

Já em alguns casos de sobrecarga de ferro secundária, como na realização de transfusões crônicas recorrentes, a terapia de quelação de ferro torna-se de extrema

importância para a sobrevivência dos indivíduos, tendo como objetivos a prevenção do acúmulo de ferro no organismo – promovendo o balanço de ferro negativo e/ou desintoxicação do ferro – e também dos danos teciduais causados por essa sobrecarga (PORTER, 2001; CANÇADO, 2007).

No que se refere à DF, atualmente o quelante mais utilizado pelos indivíduos com sobrecarga de ferro é o deferassirox, que apresenta grande afinidade e especificidade pelo ferro, sendo eliminado em sua maior parte pelas fezes (GALANELLO et al., 2003; STEINHAUSER et al., 2004). Este medicamento é capaz de promover uma quelação eficaz, contribuindo com a melhoria da qualidade de vida (INATI; KHORIATY; MUSSALAM, 2011).

1.2 Metabolismo do Ferro

O ferro é um mineral essencial para as funções celulares e participa de uma gama de processos metabólicos no organismo humano. É imprescindível para a formação da molécula de heme – sendo componente da hemoglobina e da mioglobina – e participa da geração de energia celular, transporte de oxigênio, síntese de DNA, tendo também um importante papel nos citocromos na mitocôndria, mediando a transferência de elétrons (MCDERMID; LÖNNERDAL, 2013).

Cerca de 200 bilhões de novas hemácias são produzidas diariamente no organismo humano saudável, necessitando de mais de 2×10^{15} átomos de ferro a cada segundo para manter uma eritropoiese adequada, isto é, uma quantidade de aproximadamente 20 mg de ferro para a síntese de hemoglobina, quantidade esta correspondente à 80% da demanda diária deste micronutriente (HENTZE; MUCKENTHALER; ANDREWS, 2004; MUCKENTHALER, 2017). Em pessoas saudáveis, a quantidade de ferro no organismo encontra-se em níveis constantes, sendo a maior parte proveniente da reciclagem de hemácias senescentes e, em menor quantidade, da absorção intestinal de ferro fornecido pela dieta (HENTZE et al., 2010).

Os macrófagos do baço, medula óssea e células de Kupffer reconhecem as alterações bioquímicas na superfície de hemácias senescentes, como por exemplo, a peroxidação de lipoproteínas da membrana e a modificação da proteína Banda 3, que levam ao encolhimento destas células vermelhas e à externalização da fosfatidilserina, sinalizando para que haja a sua eliminação por meio de um processo denominado eritose, ou seja, a morte programada de células vermelhas (FERNANDEZ-BOYANAPALLI et al., 2009; BACK et al., 2014). As

hemácias interagem com receptores específicos nos macrófagos, que levam à fagocitose, processo no qual ocorre a degradação de componentes destes glóbulos vermelhos e, conseqüentemente, a devolução do ferro que estava no seu interior para uma nova síntese de hemácias (KNUTSON; WESSLING-RESNICK, 2003).

No que diz respeito ao ferro proveniente da alimentação, o referido mineral encontra-se no organismo humano presente em duas formas: ferro não-heme (inorgânico), encontrado em grãos e vegetais, e o ferro heme, proveniente de alimentos de origem animal e que apresenta maior biodisponibilidade (MCDERMID; LÖNNERDAL, 2013).

1.2.1 Absorção e transporte de ferro

Indivíduos saudáveis absorvem, aproximadamente, 10% de todo o ferro proveniente da dieta, o que corresponde a cerca de 1 mg a 2 mg deste micronutriente. O ferro heme possui uma biodisponibilidade aproximadamente oito vezes maior se comparado à forma inorgânica; assim, mesmo que a ingestão de ferro heme seja menor – de 5 a 10% do total de ferro consumido nas dietas ocidentais – ele pode representar um terço do ferro absorvido pelo organismo humano (SHARP; SRAI, 2007; PORTER; GARBOWSKI, 2014).

É importante salientar que a baixa biodisponibilidade do ferro não-heme pode ser influenciada por outros componentes da dieta, que podem aumentar ou inibir sua absorção. O ácido ascórbico (vitamina C) é conhecido por potencializar a absorção deste mineral, atuando na redução do ferro no estado férrico (Fe^{3+}) para o íon ferroso (Fe^{2+}); em contrapartida, os fitatos, encontrados em cereais e compostos fenólicos, presentes em chás, chocolates, café, por exemplo, são fortes inibidores da absorção de ferro na forma inorgânica por formarem complexos insolúveis no intestino (FAIRWEATHER-TAIT; HURREL, 1996; DIAZ et al., 2003; SHARP; SRAI, 2007).

A absorção do ferro heme ocorre por mecanismos ainda não totalmente elucidados, sendo a proteína HGR-1 (também conhecida como SLC48A1) seu único transportador reconhecido (RAJAGOPAL et al., 2008; MUCKENTHALER et al., 2017). Sabe-se que, no meio intracelular, o ferro é liberado da protoporfirina por meio da ação da enzima heme oxigenase 1 (FERRIS et al., 1999; HENTZE et al., 2010).

Já no que diz respeito ao processo de absorção do ferro inorgânico, antes de ser incorporado pela célula, o mesmo necessita ser reduzido da sua forma férrica (Fe^{3+}) a íon ferroso (Fe^{2+}), sendo essa conversão realizada pela redutase citocromo b duodenal (Dcytb) – uma proteína presente na borda em escova no duodeno. Após a redução, o Fe^{2+} é carregado

para o interior da célula pelo transportador de metal divalente DMT-1 (do inglês, *divalent metal transporter 1*) (MCKIE, 2008; PORTER; GARBOWSKI, 2014).

No interior do enterócito, uma parte do ferro permanece estocada sob as formas de ferritina – forma solúvel de armazenamento e que é capaz de manter o ferro ligado à proteína, evitando que precipitados tóxicos sejam formados – e hemossiderina, a forma degradada da ferritina que se apresenta extremamente insolúvel e que permite a formação de agregados de ferro (TAKAMI; SAKAIDA, 2011).

De acordo com a demanda, o ferro presente nos enterócitos pode seguir dois caminhos: em casos em que a necessidade deste micronutriente seja baixa, ele irá permanecer armazenado ligado à ferritina e será eliminado quando houver a descamação do epitélio intestinal; no entanto, em situações em que haja requerimento de ferro, o mineral irá atravessar a membrana basolateral por meio da ferroportina (FPN) – a proteína exportadora de ferro, também presente em hepatócitos e macrófagos do sistema reticuloendotelial – e conseqüentemente exportado para o plasma, sendo transportado pela transferrina (Tf), uma glicoproteína sintetizada pelo fígado, capaz de captar átomos de ferro e facilitar a sua liberação para as células (ANDERSON; FRAZER, MCLAREN, 2009; COATES, 2014). Como a transferrina sérica possui grande afinidade pelo ferro em seu estado férrico, o Fe^{2+} é oxidado à Fe^{3+} pela ação da hefaestina e ceruloplasmina, presentes na membrana basolateral do enterócito e na circulação, respectivamente (ZHANG; ENNS, 2009).

Em circunstâncias normais, a transferrina é capaz de transportar até 12 mg de ferro, sendo essa capacidade raramente utilizada, já que em geral o ferro ocupa somente 20-30% dos sítios de ligação desta glicoproteína. Todavia, em situações em que a capacidade de ligação da Tf encontra-se totalmente saturada, o ferro circula pelo soro sob a forma de ferro não ligado à transferrina (NTBI, do inglês *non-transferrin bound iron*) (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008; INATI; KHORIATY; MUSSALAM, 2011). O ferro livre torna-se potencialmente tóxico, atuando como catalizador de reações oxidativas e na síntese de superóxidos e radicais hidroxilas, que quando convertidos em peróxido de hidrogênio causam peroxidação lipídica em diversas organelas citoplasmáticas e conseqüentemente levam ao estresse oxidativo, com a oxidação de lipídeos e proteínas, culminando em danos celulares (WARD, 2010). Órgãos como fígado e coração, e também o sistema endócrino, são particularmente expostos ao acúmulo de ferro (WORWOOD, 2002).

O ferro é internalizado na célula por meio da interação do complexo ferro-transferrina ao receptor de transferrina (TfR), localizado na superfície de grande parte das células (COATES, 2014). A clivagem deste receptor dará origem ao receptor solúvel de transferrina

sérica (sTfR), que poderá ter sua concentração na circulação reduzida, em situações como hipoplasia da série vermelha e insuficiência renal ou aumentada, como observado em anemias hemolíticas, dentre elas a AF (SKIKNE, 2008).

1.2.2 Homeostase do ferro

O organismo humano elimina o ferro por meio de secreções corpóreas, descamação da epiderme e do trato gastrointestinal e também pelo sangramento menstrual (GREEN et al, 1968). Todavia, fisiologicamente não há um mecanismo específico que possa aumentar a eliminação do ferro em excesso; logo, a regulação das concentrações deste mineral depende de alguns mecanismos intracelulares e sistêmicos, que são imprescindíveis para a aquisição e mobilização do ferro (PORTER; GARBOWSKI, 2014).

No que diz respeito à regulação intracelular, as proteínas reguladoras de ferro (IRP1 e IRP2, do inglês *iron regulatory protein*) são capazes de controlar a expressão pós-transcricional dos genes que modulam a captação e o armazenamento deste micronutriente – isto é, aqueles que codificam o DMT-1, a ferritina e a ferroportina – visando evitar a falta ou um possível excesso de ferro. Em situações nas quais as concentrações intracelulares de ferro estejam reduzidas, as IRP1 e IRP2 ligam-se a elementos responsivos ao ferro (IRE, do inglês *iron response element*) em regiões não codificantes do RNA mensageiro (RNAm) – como a região 3' não traduzida – de moléculas como a ferritina ou do TfR, protegendo a degradação do RNAm e dando continuidade à síntese proteica e, conseqüentemente, levando ao aumento da absorção de ferro celular; em contrapartida, a ligação das IRP à extremidade 5' não traduzida é capaz de inibir a tradução do RNAm em proteína, tal como ocorre com o gene que codifica o DMT-1, reduzindo a sua síntese (DUNN; RAHMANTO; RICHARDSON, 2007; MUCKENTHALER; GALY; HENTZE, 2008).

Já no que tange à regulação sistêmica, o equilíbrio entre absorção, utilização e armazenamento de ferro é realizado pela hepcidina, um hormônio polipeptídico formado a partir da transcrição do gene HAMP (GANZ; NEMETH, 2012). Sua principal via de transcrição ocorre por meio da sinalização da proteína morfogenética óssea (BMP, do inglês *bone morphogenic protein*) e da proteína homóloga decapentaplégica (SMAD); a hemojuvelina ativa a BMP ligando-se ao seu receptor específico e, posteriormente, a SMAD fosforilada liga-se à região promotora do HAMP, induzindo a transcrição de hepcidina (DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008).

A atuação da hepcidina no metabolismo de ferro foi apresentada, primeiramente, em estudos com camundongos, nos quais a deleção do gene HAMP foi capaz de provocar um acúmulo de ferro no tecido hepático destes animais, enquanto a expressão exacerbada do mesmo gene levou à uma grave anemia (PIGEON et al., 2001).

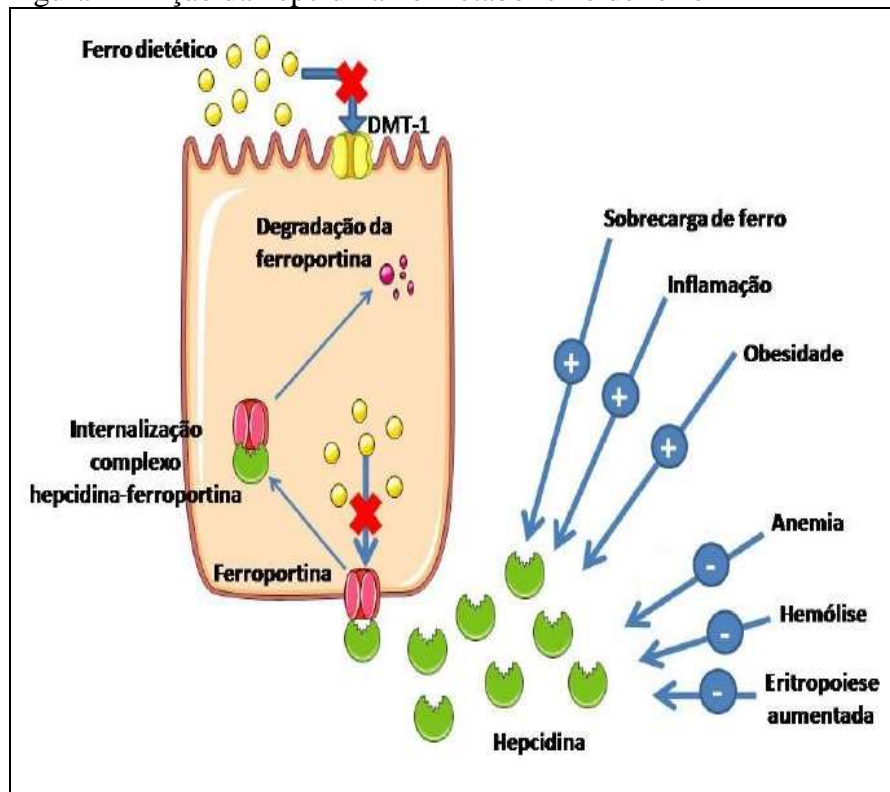
Em humanos, Park e colaboradores (2001) isolaram a hepcidina na urina humana e propuseram que este hormônio era originário do fígado e circulava no plasma até chegar à urina. No entanto, ressalta-se que embora seja produzida majoritariamente pelos hepatócitos, órgãos e células como o coração (MERLE et al., 2007), tecido adiposo (BEKRI et al., 2006), monócitos e macrófagos (THEURL et al., 2008) também são capazes de produzir hepcidina em menor escala (STEINBICKER; MUCKENTHALER, 2013).

A ação da hepcidina na homeostase do ferro ocorre por meio da sua interação com a ferroportina, formando o complexo hepcidina-ferroportina, que posteriormente é internalizado e degradado nas células em que a ferroportina é expressa. Conseqüentemente, há o bloqueio do efluxo de ferro, havendo o acúmulo intracelular deste mineral, especialmente em hepatócitos e macrófagos. A redução do fluxo de ferro para fora da célula acarreta em uma baixa saturação da transferrina sérica e na diminuição da quantidade de ferro disponível para o processo de eritropoiese (NEMETH et al., 2004; DE DOMENICO; WARD; KAPLAN, 2008). Ainda, a hepcidina age também na redução da absorção intestinal de ferro, tanto por sua ligação à ferroportina presente na membrana basolateral de enterócitos como pela inibição da transcrição do DMT-1 (DONOVAN; ROY; ANDREWS, 2006; MENA et al., 2008).

Alguns fatores são capazes de influenciar a síntese de hepcidina, regulando-a positiva ou negativamente. Em situações de sobrecarga de ferro, nota-se o aumento da expressão de hepcidina no intuito de reduzir a quantidade de ferro circulante no plasma; isto também ocorre na presença de quadros inflamatórios com a liberação de interleucinas, como a interleucina-6 (IL-6), capaz de ativar a síntese deste hormônio nos hepatócitos (GANZ; NEMETH, 2006). A obesidade apresenta-se também como um fator que pode provocar o aumento da concentração de hepcidina, visto que a leptina – adipocina produzida pelo tecido adiposo – parece ser capaz de ativar a via de sinalização de transcrição da hepcidina, de modo semelhante à IL-6 (CHUNG et al., 2007).

A regulação negativa da expressão de hepcidina ocorre na presença de fatores como a anemia e hipóxia, tendo como objetivo o aumento da absorção de ferro por parte dos enterócitos, de modo a facilitar a exportação de ferro destas células e do sistema reticuloendotelial, bem como promover o aumento da disponibilidade de ferro para a eritropoiese (NICOLAS et al., 2002) (Figura 1).

Figura 1 – Ação da hepcidina no metabolismo de ferro



Fonte: Adaptado de CARDOSO (2018).

Os mecanismos de ação em situações de anemia e hipóxia são semelhantes. Nestas situações, em que se faz necessário o maior aporte de ferro para a produção de novas hemácias, há acúmulo de fatores induzidos por hipóxia (HIF, do inglês *hypoxia-inducible factors*), que levam à transcrição do gene da eritropoietina – produzida por células renais e que também atua na produção de novos glóbulos vermelhos. Durante o processo de eritropoiese ocorre também a produção de eritroferrona (ERFE), um hormônio antagônico à síntese de hepcidina e que age inibindo a ativação da SMAD, e do fator de diferenciação de crescimento 15 (GDF-15, do inglês *growth differentiation factor-15*), que se conecta a seu receptor específico e bloqueia a transcrição do gene HAMP (KAUTZ et al., 2014; MUCKENTHALER, 2017).

1.2.3 Papel desempenhado pela hepcidina na doença falciforme

Embora nos últimos anos tenham sido publicados estudos a respeito da ação da hepcidina na DF (SHEN et al., 2015; NNODIM et al., 2015), os dados presentes na literatura ainda são limitados – haja vista que grande parte conta com poucos indivíduos e/ou com uso de faixas etárias muito amplas ou não definidas – e controversos.

No estudo publicado por Nemeth e colaboradores (2003), que incluía pessoas com anemia da inflamação, anemia ferropriva, hemocromatose hereditária, sobrecarga de ferro transfusional e indivíduos saudáveis, observou-se que os participantes com DF e sobrecarga de ferro (dois indivíduos) apresentaram níveis elevados de excreção de hepcidina urinária, se comparados ao grupo controle e àqueles com anemia por carência de ferro.

Em 2005, Ezech e colaboradores observaram que as concentrações de hepcidina sérica em adultos com DF e nos controles sem a doença não diferiram. É importante salientar que neste estudo não constavam informações a respeito da realização ou não da terapia de transfusão sanguínea.

No trabalho de Kearney e colaboradores (2007), que contava com outras hemoglobinopatias além da DF, nove crianças e adolescentes com DF e que nunca haviam realizado transfusões sanguíneas apresentaram concentrações de hepcidina urinária semelhantes às de indivíduos de mesma faixa etária com púrpura trombocitopênica idiopática – que constituíam o grupo controle pediátrico – porém menores se comparadas aos indivíduos adultos saudáveis.

Em 2009, Kroot e colaboradores observaram que em um grupo de adultos com DF com um histórico transfusional diverso (isto é, que incluía pessoas que nunca haviam realizado transfusão até indivíduos politransfundidos), as concentrações de hepcidina urinária estavam abaixo do limite inferior de detecção em cinco pacientes, enquanto nos demais os níveis destes hormônios se apresentaram similares ao grupo controle sem a doença.

Na publicação de Nnodim e colaboradores (2015), os autores notaram o aumento dos níveis de hepcidina sérica em adultos com AF se comparados ao grupo controle saudável, tendo estes indivíduos apresentado também menores concentrações de eritropoietina. Assim como no estudo de Ezech e colaboradores (2005), o referido trabalho não menciona se os participantes foram classificados quanto ao *status* de ferro corporal ou ao histórico de transfusões, que pode interferir na interpretação destes achados.

Percebe-se, então, que a heterogeneidade dos grupos estudados pode levar à diferentes resultados. É fundamental que as peculiaridades da DF sejam consideradas, principalmente no que diz respeito à diferenciação dos indivíduos – com e sem sobrecarga de ferro transfusional, fator que parece estar intimamente ligado à concentração de hepcidina.

Recentemente, alguns pesquisadores têm considerado a distinção entre os indivíduos com DF que cursam ou não com a sobrecarga de ferro transfusional. Em 2014, Mangaonkar e colaboradores notaram que pessoas com DF e sobrecarga de ferro possuíam concentrações elevadas de hepcidina sérica se comparada aos indivíduos com a referida hemoglobinopatia

não expostos à carga excessiva de ferro, o que foi corroborado em um novo estudo em 2020; no entanto, quando todos os indivíduos com a doença foram comparados com os participantes do grupo controle não foram encontradas diferenças significativas entre as concentrações de hepcidina (MANGAONKAR et al., 2020).

Em 2018, Omena e colaboradores avaliaram as concentrações de hepcidina sérica em adultos com AF, expostos ou não à sobrecarga de ferro transfusional, bem como de indivíduos sem a doença. Os níveis de hepcidina diferiram em função da carga de ferro. Os participantes com sobrecarga apresentaram níveis maiores de hepcidina se comparados aos demais grupos; em contrapartida, nos adultos com AF e sem sobrecarga de ferro, as concentrações deste hormônio foram inferiores se comparadas a do grupo controle sem a doença. Estes dados também reforçam a necessidade de considerar a presença ou ausência da sobrecarga de ferro nos grupos estudados.

Além das influências ligadas ao metabolismo do ferro, outros fatores intrínsecos à DF também devem ser considerados. Karafin e colaboradores (2015) investigaram a relação entre possíveis fatores que poderiam contribuir com estas alterações na hepcidina sérica de adultos com AF. Marcadores da eritropoiese (reticulócitos, eritropoietina e GDF-15), inflamação (proteína C reativa ultrasensível – PCRus) e da carga de ferro (ferritina), assim como o número de transfusões no último ano foram significativamente associados à hepcidina, sendo a atividade eritropoiética o fator mais forte capaz de influenciar a concentração deste hormônio. No entanto, ressalta-se que estes autores avaliaram uma população de estudo que também não fora categorizada quanto ao *status* corporal de ferro e os valores de ferritina variavam desde 20 ng/dL até 12.300 ng/dL.

1.2.4 Parâmetros de mensuração do ferro

De acordo com as diretrizes para avaliação da sobrecarga de ferro, diversos métodos (diretos ou indiretos) podem ser utilizados para mensurar a quantidade deste micronutriente no organismo humano (ANGELUCCI et al., 2008; REMACHA et al., 2013).

No que diz respeito ao método direto, a biópsia é considerada como padrão-ouro por ser capaz de avaliar com precisão a sobrecarga de ferro em um tecido específico, caracterizando também seu padrão de acúmulo no órgão analisado. A quantificação da concentração de ferro por grama de tecido hepático, por exemplo, é capaz de refletir de maneira fidedigna a quantidade total de ferro no organismo. Considera-se a concentração hepática de ferro (LIC, do inglês *liver iron concentration*) normal até 2 mg/g de peso seco do

tecido hepático, enquanto concentrações entre 3 mg e 7 mg/g de peso seco já configuram o risco leve de complicações, e moderado quando superior à 7 mg/g de peso seco (BRITTENHAM, 2011), sendo indicado o início da terapia de quelação de ferro a partir deste valor (NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2002). Contudo, o fato de ser um procedimento invasivo e que pode envolver possíveis complicações, faz da biópsia um método não muito utilizado (AULT; JONES, 2009).

Na prática clínica, a dosagem de ferritina sérica apresenta-se como o método mais utilizado e que avalia indiretamente a quantidade de ferro, sendo de fácil realização, boa reprodutibilidade e baixo custo (CANÇADO, 2007). A sobrecarga de ferro é caracterizada a partir de valores iguais ou superiores a 1000 ng/mL, que geralmente indicam o início do uso de quelantes de ferro; já a sobrecarga severa é considerada em casos em que as concentrações de ferritina estejam acima de 2500 ng/mL (ANGELUCCI et al., 2008; THURET, 2013).

Ainda que a ferritina seja caracterizada como uma das principais ferramentas que auxiliam no monitoramento da quantidade de ferro no organismo, salienta-se que esta proteína sofre a influência de fatores como hepatopatias, doenças inflamatórias, neoplasias e o uso excessivo de bebidas alcoólicas, capazes de afetar os resultados encontrados (IOANNOU et al., 2004; KOHGO et al., 2008; SMILEY; DAGOGO-JACK; UMPIERREZ, 2008). No que se refere à DF, a ferritina pode estar elevada em situações em que haja infecções e crises vaso-occlusivas, não necessariamente refletindo a piora do quadro de sobrecarga de ferro (BALLAS, 2001).

O receptor solúvel de transferrina sérica (sTfR) também pode ser utilizado para avaliar o estado corporal de ferro porque sua síntese é induzida pela diminuição do aporte de ferro, levando a célula a captar o ferro de forma mais eficiente (BAKER et al., 2010). Na DF, Tancabelic e colaboradores (1999) notaram o aumento das concentrações de sTfR em indivíduos não-transfundidos regularmente devido à grande atividade eritropoiética, enquanto os pacientes que realizavam transfusões crônicas apresentaram níveis destes receptores menores do que o referido grupo; no entanto, observou-se também que os valores de sTfR nos cronicamente transfundidos eram consideravelmente elevados se comparados a indivíduos saudáveis, o que indicaria que a atividade eritropoiética nesta hemoglobinopatia encontrava-se acima do normal mesmo com a realização de transfusões regulares – resultado também corroborado por Fertrin e colaboradores (2014).

Outro método que pode ser utilizado para mensurar a concentração de ferro no organismo humano é a utilização de exames de imagens, como a ressonância magnética – uma técnica não invasiva, segura e que é capaz de estimar as concentrações hepática e

cardíaca de ferro. A concentração hepática de ferro pode prever com precisão os estoques totais de ferro corporal, sem contar com as possíveis intercorrências de métodos invasivos como a biópsia (ANGELUCCI et al., 2000; HOFFBRAND; TAHER; CAPPELLINI, 2012).

1.3 Nutrição na doença falciforme e em doenças que cursam com sobrecarga de ferro: Restrição de ferro dietético e políticas públicas de controle da anemia ferropriva

A nutrição voltada para doenças que cursam com sobrecarga de ferro ainda é um tema pouco em voga na literatura científica. Embora os profissionais de saúde comumente orientem a restrição do consumo de alimentos ricos em ferro, como carnes e vísceras (OHEMENG; BOADU, 2018; TEIXEIRA, 2020), bem como a inclusão do consumo de chás e café durante as grandes refeições, a fim de reduzir a biodisponibilidade de ferro (VILLELA; ROCHA, 2008), os estudos a respeito deste tema ainda são controversos e possuem diversas limitações. Grande parte dos estudos não analisa os resultados com base na presença ou ausência de sobrecarga de ferro.

No que se refere especificamente à DF, como a absorção e homeostase de ferro ainda não foram completamente compreendidas, estas condutas são feitas de forma preventiva. Todavia, orientações quanto à restrição destes alimentos podem levar à redução do consumo e da biodisponibilidade de outros minerais, como o zinco, que compartilha diversas fontes alimentares com o ferro. Portanto, a adoção destas condutas poderia contribuir para o agravamento do quadro de deficiência de zinco, um achado clínico comum em crianças com esta hemoglobinopatia (ZEMEL et al., 2002).

Ainda, a restrição de alimentos como carne e vísceras pode causar um impacto negativo no aporte de proteínas a estes indivíduos. Sabe-se que as pessoas com DF cursam com o aumento da necessidade de nutrientes devido ao quadro de hemólise crônica, assim como um *turnover* proteico acelerado (BARDEN et al., 2000; HYACINTH; GEE; HIBBERT, 2010). Deficiências proteicas são comumente refletidas na menarca atrasada, atraso na maturação do esqueleto e na função imune prejudicada (REED; REDDING-LALLINGER; ORRINGER, 1987).

Em contrapartida, tanto os pacientes com DF como aqueles com as demais doenças que cursam com sobrecarga de ferro estão expostos às ações de políticas que visam à prevenção da anemia ferropriva, como o Programa Nacional de Suplementação de Ferro (PNSF) e a fortificação de farinhas de trigo e milho (BRASIL, 2013). O PNSF, desenvolvido desde 2005, consiste na suplementação com sulfato ferroso para crianças entre 6-24 meses de

idade, gestantes e mulheres até o terceiro mês pós-parto com doses que podem chegar próximo ao Limite de Ingestão Máxima Tolerável (UL, do inglês *tolerable upper intake level*) (INSTITUTE OF MEDICINE, 2011). Já a fortificação das farinhas de trigo e milho foram implementadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), pela Resolução RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002 (BRASIL, 2002b), e revista pela RDC nº 150, de 13 de abril de 2017 (BRASIL, 2017) e consistem no enriquecimento obrigatório das farinhas de trigo e milho com ferro (e também ácido fólico), contendo teores de 4 a 9 mg ferro/ 100 g de farinha nas formas de sulfato ou fumarato ferroso.

Embora estas medidas sejam destinadas à população brasileira em geral, desconhece-se ainda a sua segurança para indivíduos que possam cursar com o acúmulo deste micronutriente. Até o presente momento, os dados a respeito da absorção intestinal de ferro na DF impossibilitam a garantia de que estas ações não causem malefícios a este grupo.

Apesar de não existirem dados na literatura a respeito da prevalência de sobrecarga de ferro na DF, observa-se na prática clínica que a maioria dos pacientes não apresenta este quadro. É importante ressaltar que diversas publicações observaram a deficiência de ferro em pessoas com esta hemoglobinopatia. Vichinsky e colaboradores (1981) observaram deficiência de ferro em 9% dos participantes do estudo, sendo todos pacientes não-transfundidos e com idade inferior a 6 anos. Resultados semelhantes foram achados na publicação de King, Reid e Forrester (2015) – em que a prevalência de deficiência de ferro foi de 8,5% em uma população de crianças jamaicanas menores de 5 anos de idade – e também no estudo de Kassim e colaboradores (2012), realizados com indivíduos de 1 a 30 anos, em que 13,3% dos participantes apresentaram ferropenia. No Brasil, em 2011, Rodrigues e colaboradores observaram que 17,8% das crianças de seu estudo menores de dois anos com DF apresentaram deficiência de ferro e, se consideradas apenas as que não receberam transfusão, 19,5% dos participantes apresentaram ferropenia.

A hepcidina parece ter sua produção aumentada em situações de DF e sobrecarga de ferro, sugerindo que nestes casos os indivíduos expostos à carga excessiva deste mineral não precisariam reduzir a ingestão de alimentos ricos em ferro (OMENA et al., 2018; MANGAONKAR et al., 2020). Em contrapartida, em pessoas que não cursam com sobrecarga, a supressão da hepcidina parece ocorrer devido ao aumento da eritropoiese – em resposta à anemia característica da doença – o que, conseqüentemente, poderia levar ao aumento da absorção de ferro (OMENA et al., 2018). Todavia, estes resultados ainda não são suficientes para o estabelecimento de recomendações nutricionais, visto que alguns aspectos

ainda precisam ser aprofundados. A estimativa da absorção de ferro na presença ou ausência da sobrecarga deste micronutriente torna-se essencial para elucidar estas questões.

1.4 Testes de absorção de ferro

Os testes de absorção são realizados tendo como objetivo estudar o *turnover* de alguns minerais, bem como avaliar a sua biodisponibilidade e efeitos de doenças na absorção/metabolismo de micronutrientes (ABRAMS, 1999).

A biodisponibilidade talvez seja o principal alvo deste tipo de estudo e é definida como a fração de um nutriente ingerido que é absorvida e que tem potencial para suprir as demandas fisiológicas em determinados tecidos (HURRELL, 2002). Especificamente no que diz respeito ao ferro, a sua biodisponibilidade é a medida da fração de ferro alimentar capaz de ser absorvida pelo trato gastrointestinal, armazenada e incorporada ao heme, sendo influenciada por fatores como: necessidades nutricionais do indivíduo, estados fisiológicos e patologias (IAEA, 2012).

O teste oral de absorção de ferro apresenta-se como um dos métodos mais utilizados para avaliar a absorção intestinal deste micronutriente em humanos, podendo ser realizado de diferentes formas. Uma de suas aplicações mais frequentemente empregadas consiste na ingestão de tabletes ou elixires de sais ferrosos – como o sulfato ou citrato ferroso – e posteriormente na análise de fatores como o ferro sérico, a ferritina sérica, a capacidade total de ligação de ferro à transferrina, o receptor de transferrina e/ou o percentual de saturação de transferrina sérica (JOOSTEN; VANDER ELST; BILLEN, 1997; JENSEN et al., 1998; KOBUNE et al., 2011). No tempo basal e após a ingestão dos sais, são realizadas coletas de sangue a fim de avaliar a diferença de concentração nos marcadores anteriormente descritos antes e após a intervenção.

Embora estes testes de absorção sejam relativamente simples e pouco dispendiosos, há algumas desvantagens em sua realização. Ressalta-se que estes marcadores bioquímicos do metabolismo de ferro podem ser influenciados pela presença de inflamação e hepatopatias e precisam ser analisados cuidadosamente (COOK et al., 2005). Ainda, destaca-se o fato do participante ser submetido a diversas punções venosas num curto espaço de tempo, como observado no estudo de Kobune e colaboradores (2011), em que as variações na concentração dos marcadores laboratoriais foram analisadas nos tempos basal, 15, 30, 60, 120 e 180 minutos – isto é, o mesmo indivíduo teve o sangue coletado em 6 momentos diferentes – implicando em um maior desconforto para o participante.

Dadas estas dificuldades, outro método que pode ser empregado é o uso de isótopos de ferro (radioativos ou estáveis). Como grande parte do ferro absorvido é incorporada aos glóbulos vermelhos, a grande vantagem desta técnica é poder estimar, de fato, a fração do micronutriente em questão que é biodisponível – seja ele proveniente tanto da absorção intestinal quanto da reciclagem de hemácias e da mobilização dos estoques de ferro (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012).

O conhecimento sobre a absorção deste micronutriente pode levar à elaboração de guias alimentares específicos voltados para determinadas populações, visto que suas recomendações poderão ser estabelecidas com maior precisão.

1.4.1 Radioisótopos

Isótopos, do grego, “*isos*” (mesmo) e “*topos*” (lugar), são átomos de um mesmo elemento químico, cujos núcleos têm o mesmo número atômico – isto é, o mesmo número de prótons – porém diferentes números de nêutrons e, portanto, distintas massas atômicas (SODDY, 1913).

Radioisótopos – também denominados de isótopos radioativos – são caracterizados por apresentarem um núcleo atômico instável que emite a energia acumulada à medida que se transforma em um isótopo mais estável, a ponto de produzir fluorescência. Este fenômeno de emissão é denominado como decaimento radioativo – expresso em termos de meia-vida, que é o tempo para a atividade de um elemento radioativo decair à metade do seu valor original. A energia liberada neste processo pode ser chamada de partícula alfa, partícula beta ou radiação gama (XAVIER et al., 2007).

Os estudos com isótopos radioativos começaram a ser largamente empregados em meados dos anos 30-40, como por exemplo, o estudo publicado por Hanhn e colaboradores (1939) a respeito do metabolismo de ferro na anemia, que utilizou os radioisótopos ^{55}Fe e ^{59}Fe . Desde então, estes estudos têm sido amplamente realizados devido à grande vantagem do indivíduo ser o seu próprio controle (ABRAMS, 1999).

A base do método que utiliza isótopos radioativos em estudos de nutrição está relacionada à marcação de um alimento, que pode ser extrínseca ou intrínseca. A marcação extrínseca caracteriza-se pela adição de um radioisótopo, comumente utilizado na forma de um sal inorgânico, diretamente ao alimento que será avaliado; já a marcação intrínseca consiste na incorporação biológica deste elemento dentro da porção comestível do alimento, sendo incorporado biologicamente aos tecidos vegetais ou animais durante o crescimento e

desenvolvimento (IAEA, 2012). Ambos os tipos de marcação se apresentam eficientes para o estudo de biodisponibilidade de ferro (DONANGELO et al., 2003).

A absorção de ferro pode ser avaliada calculando a diferença entre a quantidade de isótopos administrados e aquela que é encontrada no sangue (incorporação de ferro nas hemácias) ou no organismo como um todo (contagem corporal total) (HOPPE, 2008).

A contagem corporal total de ferro pode ser realizada com radioisótopos emissores de raios gama, no qual geralmente um alimento é marcado com ^{59}Fe e administrado e, uma a cinco horas após sua ingestão, é realizada a contagem corporal antes de sua eliminação por meio das fezes. Após um período de 10-14 dias, nota-se que o radioisótopo atinge um estágio de equilíbrio no organismo humano. Desta forma, o ^{59}Fe é detectado por meio de cintilação sólida e, conseqüentemente, a fração do isótopo que ficou retida no corpo após a ingestão é mensurada (IAEA, 2012). Em relação à incorporação do ferro nas hemácias, sabe-se que em indivíduos saudáveis cerca de 80% do ferro absorvido é incorporado. Contudo, este valor pode diferir dependendo do estado de ferro corporal do indivíduo, bem como a presença ou ausência de inflamação e infecção (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012). Em algumas publicações com isótopos radioativos, realizados em meados dos anos 40, foi observado que o tempo necessário para grande parte do ferro ser incorporado às hemácias é de cerca de duas semanas para adultos saudáveis (DUBACH; MOORE; MINNICH, 1946; FINCH et al., 1949) e de 28 dias em lactentes (FOMON et al., 2000).

Estudos com o uso de isótopos radioativos em hemoglobinopatias, em especial na DF, foram realizados nas décadas de 60 e 70, porém são ainda limitados. Erlandson e colaboradores (1962) administraram 5 mg de ^{59}Fe (1 μCi) sob a forma de sulfato ferroso em uma população diversificada, com crianças e adultos com DF (genótipos SS e SC), talassemia, esferocitose hereditária e anemias não especificadas, além de crianças saudáveis. Após 5 dias, os cinco participantes com DF absorveram de 12% - 51% do ferro administrado, sendo os maiores valores encontrados em indivíduos SS. Os autores indicam que a absorção de ferro pode ser reduzida em casos de transfusões sanguíneas, o que levaria à supressão da eritropoiese. No entanto, ressalta-se que este comentário é realizado considerando as hemoglobinopatias como um todo e que, no que se refere especificamente à DF, o comportamento transfusional dos participantes era diverso, sendo esta uma limitação do estudo.

Em 1970, Ringelhan, Konotey-Ahulu e Dodu realizaram o teste de absorção com a administração oral de 5 μCi de ^{59}Fe em 5 mg de sulfato ferroso e 100 mg de ácido ascórbico diluído em água, em 17 homens de genótipos SS e SC, bem como com homozigose para

hemoglobinopatia C e controles saudáveis. A incorporação do ferro nas hemácias foi calculada após o sétimo e oitavo dia, sendo usada a razão entre a contagem da radiação de partículas por minuto e a contagem total por minuto do isótopo administrado. A maior taxa de absorção de ferro foi observada em pacientes com genótipo SS (média de 74%), que apresentavam hematócrito menor em relação aos demais grupos. No entanto, houve uma grande dispersão em torno da média dos grupos estudados e as diferenças não foram estatisticamente significativas. Os autores não fazem menção ao histórico transfusional dos participantes.

Embora o uso de radioisótopos seja de grande valia para o conhecimento do metabolismo de ferro, há algumas desvantagens em sua realização, como por exemplo, meias-vidas prolongadas (cerca de 45 dias para o ^{59}Fe e de 2,94 anos para o ^{55}Fe) e também seu uso limitado – sendo necessário obter licenças especiais para trabalhar com estes isótopos (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012).

A radioatividade pode ser nociva ao organismo, já que células vivas expostas à radiação podem sofrer mudanças em suas características físico-químicas, sendo destruídas ou alteradas por meio da ionização celular. No entanto, este processo irá depender de fatores como a duração da exposição e da intensidade da dose a qual o indivíduo foi submetido (HAN; YU, 2011).

Ainda que os isótopos radioativos sejam utilizados em alguns estudos mais recentes (HURRELL et al., 2006; BEISEIGEL et al., 2007), o emprego deste método encontra-se restrito a grupos populacionais formados por adultos saudáveis e não gestantes. Por mais que nestes casos a exposição à radiação ionizante não costume ser prolongada ou de alta intensidade, e efeitos adversos em relação à administração de radioisótopos nos estudos de absorção de ferro não tenham sido documentados, há uma preocupação com o uso de radioisótopos em mulheres grávidas e crianças, além de indivíduos com diferentes patologias. Nestes casos, o uso de isótopos estáveis de ferro apresenta-se como uma alternativa, já que pode ser aplicado em diversos grupos populacionais de interesse (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012).

1.4.2 Isótopos estáveis

Assim como os radioisótopos, os isótopos estáveis são átomos de um elemento químico cujas massas atômicas diferem, porém, ao contrário dos isótopos radioativos, os

estáveis não sofrem decaimento e, portanto, não são capazes de emitir radiação (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012).

Embora o uso de isótopos estáveis tenha sido já relatado na década de 1960, poucos estudos foram realizados até o início dos anos 80. A maior parte dos trabalhos realizados até então envolviam somente adultos (LOWMAN; KRIVIT, 1963; KING; RAYNOLDS; MARGEN, 1978), porém a partir desta data começaram a ser realizados também estudos pediátricos (FOMON; ZIEGLER; NELSON, 1993; KASTENMAYER et al., 1994; CHEN et al., 2005).

Até o presente momento, não foram encontrados riscos ou efeitos adversos na administração destes isótopos, o que torna segura a sua administração em diferentes populações (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012). Uma grande vantagem deste método é que mais de um isótopo pode ser administrado no mesmo indivíduo simultaneamente (via oral e/ou intravenosa), a fim de comparar a biodisponibilidade de alimentos (JUNQUEIRA-FRANCO et al., 2018) e até mesmo para avaliar interações de micronutrientes entre si, como por exemplo do ferro com o zinco (O'BRIEN et al., 2000) e com o cálcio (ABRAMS et al., 1996), além de fitatos e polifenóis (PETRY et al., 2012).

Especificamente em relação ao ferro, existem quatro tipos de isótopos estáveis presentes em quantidades fixas no ambiente e nos alimentos que ingerimos. Sua abundância ocorre naturalmente, em diferentes proporções: ^{54}Fe (5,8%); ^{56}Fe (91,8%); ^{57}Fe (2,1%); ^{58}Fe (0,3%) (WALCZYK; VON BLANCKENBURG, 2005). Destes, os isótopos de menor abundância – ^{58}Fe e ^{57}Fe – são os mais utilizados em pesquisas a respeito de nutrição humana, sendo normalmente fornecidos sob a forma de metal de ferro e convertidos em sulfato ferroso antes de sua administração via oral (ABRAMS, 1999).

Embora suas quantidades sejam bem determinadas na natureza, a análise isotópica do sangue humano indica que cada indivíduo possui uma assinatura isotópica de ferro a longo prazo. Em 2002, Walczyk e von Blanckenburg observaram variações na razão $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ e que, conseqüentemente, levam a diferenças na composição destes isótopos entre os sexos, tendo os homens uma maior proporção de isótopos mais leves de ferro (isto é, aqueles com menor número de nêutrons) se comparado às mulheres. Ainda, os autores relatam que ferro contido no sangue parece refletir o ferro dietético – que é isotopicamente mais leve do que o referido mineral na geosfera, mas semelhante em produtos de origem animal (porcos, galinhas, carne bovina, dentre outros) – e que as diferenças observadas entre indivíduos do sexo masculino e feminino se devem justamente à absorção de ferro na dieta – já que as mulheres perdem uma

quantidade maior deste micronutriente devido à menstruação e, conseqüentemente, possuem um requerimento mais elevado.

Assim como os radioisótopos, a marcação de um alimento ou bebida com isótopos estáveis pode ser extrínseca ou intrínseca e sua avaliação pode ocorrer por meio da análise da incorporação do isótopo de ferro nas hemácias após duas semanas da sua administração (INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY, 2012).

O principal método usado atualmente para a análise dos isótopos estáveis é a espectrometria de massa, que identifica a quantidade e o tipo de substâncias químicas presentes em uma amostra. Íons são produzidos a partir de elementos contidos nesta amostra, sendo separados por campos elétricos e/ou magnéticos de acordo com a razão massa/carga e apresentando os tipos de íons e suas quantidades presentes. A partir do registro obtido (espectro de massas), a massa do íon é usada para determinar a composição do elemento ou a assinatura isotópica de um composto (GROSS, 2010). Este método será detalhado mais adiante.

Ainda que os isótopos estáveis sejam mais caros do que os radioisótopos, sua utilização apresenta inúmeras vantagens. Além de não exercerem radiação ionizante, como mencionado anteriormente, as amostras marcadas e os próprios isótopos podem ser armazenados indefinidamente, já que não há decaimento; além disso, são cada vez maiores os gastos com a eliminação de resíduos radioativos, o que poderia compensar o fato dos isótopos estáveis serem dispendiosos (VAN CAMPEN; GLAHN, 1999).

Na prática clínica é pouco provável que a análise dos isótopos de ferro no sangue seja extensamente explorada. No entanto, para fins de pesquisa, a sua utilização é de extrema valia, podendo identificar características dentro de uma população que carregue uma determinada predisposição para absorver o ferro de forma menos ou mais eficiente – e que levaria ao risco de desenvolvimento de uma deficiência ou sobrecarga de ferro, por exemplo (WALCZYK; VON BLANCKENBURG, 2005).

No que tange à carga excessiva de ferro, Krayenbuehl e colaboradores (2005) analisaram alterações na composição isotópica deste mineral em pacientes com hemocromatose hereditária – desordem genética que leva ao acúmulo patológico de ferro devido ao controle inefetivo da absorção deste micronutriente. Observou-se que o sangue dos indivíduos com hemocromatose era caracterizado por uma razão isotópica $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$ maior se comparada aos controles saudáveis e que esta razão se correlaciona significativamente com o acúmulo de ferro total no organismo, com a gravidade clínica da doença e com a necessidade da realização de flebotomias.

Quanto ao uso de isótopos estáveis de ferro na avaliação da absorção deste micronutriente em situações de sobrecarga, destaca-se o trabalho de Ruivard e colaboradores (2009). Nesta publicação, os pesquisadores compararam a absorção intestinal de ferro em homens com e sem síndrome dismetabólica de sobrecarga de ferro – caracterizada por um aumento dos estoques de ferro no organismo (em especial no tecido hepático) associado a componentes da síndrome metabólica – por meio da administração via oral de ^{58}Fe . Observou-se que a absorção intestinal de ferro era menor nos indivíduos com a síndrome em comparação ao grupo controle sem a doença (formado por indivíduos magros e com sobrepeso); além deste resultado, os autores também notaram que houve uma correlação inversa entre a absorção intestinal de ferro e as concentrações de hepcidina plasmática, o que pode indicar que essa diminuição da absorção está relacionada ao aumento da produção deste hormônio regulador (RUIVARD et al., 2009).

Em relação à DF, até o momento não há estudos com isótopos estáveis que avaliem a absorção de ferro. Como a análise destes isótopos apresenta-se como uma boa ferramenta para compreender o metabolismo deste micronutriente, sua utilização pode ser extremamente útil para elucidar as lacunas ainda existentes quanto às diferenças da absorção de ferro nesta hemoglobinopatia, seja em situações de sobrecarga de ferro ou naqueles indivíduos que não estão expostos à carga excessiva deste mineral.

2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Ainda não foram estabelecidas orientações alimentares e nutricionais para doenças caracterizadas pela presença de sobrecarga de ferro. A hepcidina é um hormônio que diminui a biodisponibilidade do ferro. Seus níveis aumentam em resposta ao aumento dos estoques de ferro. Portanto, as condições da sobrecarga de ferro poderiam, hipoteticamente, desencadear um mecanismo autorregulatório de redução da absorção intestinal de ferro. Entretanto, sabe-se que, em algumas condições genéticas, os mecanismos de controle de absorção intestinal de ferro encontram-se desregulados ocasionando sobrecarga de ferro primária.

Portanto, a hipótese deste estudo é que as pessoas com sobrecarga de ferro primária necessitam restringir a ingestão de ferro dietético, diferentemente das pessoas com sobrecarga de ferro secundária, as quais não necessitam desta restrição dietética devido a mecanismos autorregulatórios de controle de absorção de ferro.

Dentre as doenças que cursam com sobrecarga de ferro secundária, a DF merece destaque devido à sua prevalência no Brasil. Embora alguns estudos já tenham observado maiores concentrações de hepcidina em indivíduos com DF e sobrecarga de ferro, os resultados ainda são controversos e alguns aspectos do metabolismo de ferro precisam ser aprofundados para se compreender o risco de desenvolvimento e/ou agravamento da sobrecarga de ferro nesta doença.

A lacuna no conhecimento sobre a capacidade absorptiva de ferro na presença ou ausência de sobrecarga imprime dificuldades na elaboração de um protocolo nutricional adequado às necessidades destes pacientes que vise, por exemplo, uma melhor orientação quanto à recomendação da ingestão de alimentos fonte de ferro. Ainda assim, muitos profissionais de saúde têm orientado estas pessoas a adotarem dietas pobres em ferro e a consumirem chás e leites, a fim de diminuir a biodisponibilidade deste micronutriente.

Que seja do nosso conhecimento, ainda não existem estudos que avaliem a absorção de ferro em adultos com AF considerando a ausência ou presença da sobrecarga de ferro.

Assim, a compreensão das bases que fundamentam as prescrições dietéticas para pacientes com sobrecarga de ferro e o conhecimento da absorção deste micronutriente na DF poderão contribuir para o aprimoramento da prescrição nutricional e auxiliar na criação de diretrizes que norteiem a conduta nutricional nestes casos. A Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde do Brasil manifestou interesse na realização desta pesquisa (Anexo A), pois estes resultados poderão trazer informações relevantes sobre o risco a que as pessoas com DF e sobrecarga de ferro estão expostas ao consumirem as fontes alimentares de ferro e alimentos fortificados, como as farinhas de trigo e milho, por exemplo.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Compreender as bases existentes para as recomendações dietéticas a indivíduos com sobrecarga de ferro e avaliar a absorção deste micronutriente em pessoas com anemia falciforme.

3.2 Objetivos Específicos

Sistematizar as informações sobre a prescrição de ferro dietético em doenças que cursam com sobrecarga de ferro primária e secundária.

Avaliar a capacidade de absorção de ferro em adultos com anemia falciforme.

Comparar a capacidade de absorção de ferro entre os indivíduos com anemia falciforme expostos e não-expostos à sobrecarga de ferro.

Verificar se as concentrações de hepcidina sérica concordam com a capacidade de absorção de ferro.

4 MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Este trabalho foi dividido em duas partes. A primeira é constituída por artigo de revisão de escopo, método que permite mapear os principais conceitos de uma determinada área de pesquisa e identificar lacunas na literatura, tendo como desfecho a sistematização de estudos que embasam prescrições dietéticas para pacientes com sobrecarga de ferro. Já a segunda trata-se de um estudo experimental e comparativo, tendo como desfecho a avaliação da capacidade da absorção de ferro em adultos com AF, com a presença ou ausência de sobrecarga de ferro.

4.2 Aspectos éticos

O presente projeto de pesquisa foi submetido para apreciação ética por meio da Plataforma Brasil (<http://aplicacao.saude.gov.br/plataformabrasil>) e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto, sob o parecer de número 2.695.418 (Anexo B), e do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti – Hemorio –, sob o número 419/17 (Anexo C). Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) antes de ingressar na pesquisa (Apêndices A e B), conforme a Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde.

4.3 Métodos do estudo

4.3.1 Revisão de escopo

A presente revisão de escopo foi realizada de acordo com o método proposto pelo Instituto Joanna Briggs (PETERS et al., 2020) e pelo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses* (PRISMA) (MOHER et al., 2009). A questão norteadora do estudo foi: “O que se sabe a respeito dos efeitos de alimentos e nutrientes em doenças que cursam com sobrecarga de ferro?”.

A pesquisa foi conduzida utilizando as seguintes bases de dados: MEDLINE via Ovid Scopus, *Web of Science* e *Cochrane Library*. Os termos MeSH e palavras-chave foram:

sobrecarga de ferro, hemocromatose, hemoglobinopatias, doença falciforme, talassemia, dietoterapia e tratamento nutricional. Os termos “e”, “ou” ou “não” foram usados em conjunto com as palavras-chave. Apenas estudos publicados na língua inglesa foram considerados.

Inicialmente, dois revisores selecionaram os títulos de resumos de todas as publicações obtidas e realizaram uma avaliação independente do texto na íntegra de estudos potencialmente relevantes que deveriam ser incluídos na revisão. As divergências foram resolvidas em consenso entre os autores.

Para a inclusão na presente revisão, foram considerados estudos experimentais (randomizados e não randomizados), quase-experimentais (isto é, aqueles que o delineamento não tem distribuição aleatória dos sujeitos por tratamento e/ou a presença de grupo controle) e estudos do tipo “antes e depois” (estudos não controlados). Estudos qualitativos, revisões e resumos de conferências foram excluídos do estudo.

Os estudos foram agrupados de acordo com o alimento ou componente alimentar investigado, destacando a população estudada.

4.3.2 Capacidade de absorção intestinal de ferro

4.3.2.1 População do estudo

Estão incluídos no presente estudo adultos de 19 a 50 anos de idade.

Optou-se pela amostragem não probabilística, de conveniência, sendo os grupos participantes da pesquisa compostos por indivíduos com e sem anemia falciforme.

Os grupos formados por pessoas com a hemoglobinopatia em questão contam com pacientes atendidos no Ambulatório de Anemia Hemolítica de Adultos do Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti, conhecido como Hemorio. Já o grupo de indivíduos sem AF foi composto por estudantes, funcionários da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), bem como pessoas conhecidas dos participantes que concordaram em participar da pesquisa, pareados por sexo, idade e cor/raça.

Para participarem do presente estudo, fez-se necessário que os participantes tivessem a possibilidade de comparecer aos locais solicitados para a realização dos exames e, no caso das mulheres, que estivessem em idade reprodutiva.

Adotou-se como critério de exclusão: hospitalização nos 30 dias e/ou realização de transfusões sanguíneas nos 15 dias anteriores à primeira participação na pesquisa, bem como durante o período de avaliação da capacidade da absorção intestinal de ferro; presença de

doenças autoimunes e/ou uso de medicamentos para diabetes; uso de eritropoietina; realização de cirurgia bariátrica; mulheres no período de menopausa e gestantes.

Ao todo, foram avaliados 25 indivíduos, sendo divididos nos grupos com AF e sobrecarga de ferro (n=03), AF sem sobrecarga de ferro (n=10) e indivíduos sem a doença – grupo controle (n=12). O grupo de indivíduos com sobrecarga de ferro foi composto por indivíduos que apresentaram ferritina sérica igual ou maior a 1000 ng/mL; já os pacientes com concentrações de ferritina menores que 1000 ng/mL foram alocados no grupo com AF sem sobrecarga de ferro.

4.3.2.2 Etapas do estudo

A primeira etapa do estudo consistiu na sensibilização dos indivíduos para a importância da participação na pesquisa.

No que tange aos pacientes atendidos no Ambulatório de Anemia Hemolítica de Adultos do Hemorio, o convite para a participação foi realizado por nutricionistas do NUTRIFAL, no momento em que aguardavam para a realização de exames laboratoriais – previamente solicitados pelos hematologistas da instituição.

Já no que diz respeito às pessoas sem AF, foram realizados avisos por meio de mídias sociais, solicitando voluntários e exaltando a importância da participação no presente estudo.

Todas as etapas da pesquisa, bem como todos os itens presentes no TCLE, foram explicados antes da assinatura do paciente.

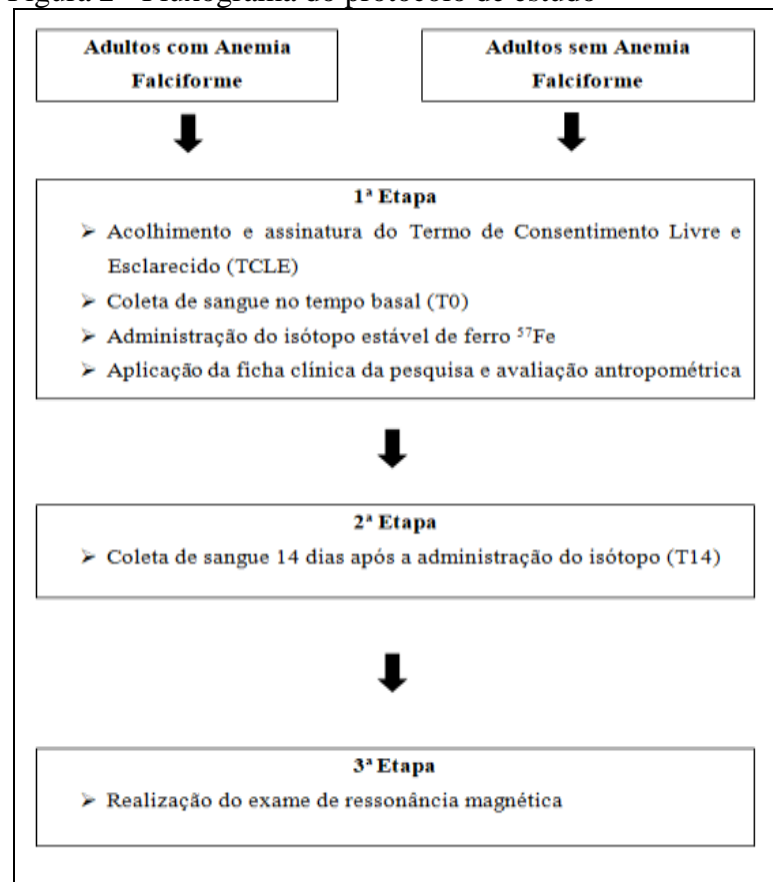
Os participantes com AF atendidos no Hemorio realizaram a primeira etapa em suas instituições de tratamento. Primeiramente, foi solicitada a coleta de sangue para a realização de análises laboratoriais; em seguida, o participante realizou a ingestão de uma preparação padronizada contendo 5 mg de isótopo de ferro ^{57}Fe e, posteriormente, foi realizado o preenchimento da ficha clínica da pesquisa, bem como a avaliação antropométrica (peso, altura e IMC). Já a segunda etapa ocorreu 14 dias após a administração do referido isótopo, sendo realizada no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação Nutricional (LIAN), localizado no Instituto de Nutrição da UERJ.

No que diz respeito aos indivíduos sem a doença, as etapas foram realizadas no LIAN, também obedecendo ao intervalo de 14 dias entre as duas participações. Devido à impossibilidade de comparecimento na UERJ em decorrência da pandemia de Coronavírus, alguns participantes do referido grupo realizaram as duas primeiras etapas em domicílio.

Em uma terceira etapa, os participantes foram convidados a realizar um exame de ressonância magnética do abdome no Hospital Universitário Pedro Ernesto, cujo objetivo foi avaliar a concentração hepática de ferro.

O fluxograma do protocolo de estudo está descrito na Figura 2.

Figura 2 - Fluxograma do protocolo de estudo



Fonte: O autor, 2020.

4.3.2.3 Análises Laboratoriais

Os exames laboratoriais desta pesquisa consistiram em: determinação do hemograma completo, dosagens de hepcidina sérica, ferritina, ferro sérico, capacidade total de ligação de ferro, interleucina-6, proteína C reativa (PCR), determinação do índice de saturação da transferrina, bem como a incorporação de ferro nas hemácias, nos participantes com e sem a doença falciforme.

Para análises hematológicas, o sangue foi coletado em tubos com anticoagulante (EDTA); já para a determinação da absorção de ferro, foram utilizados tubos com heparina, com o objetivo de não causar interferências na avaliação do ferro. Por fim, para as análises

sorológicas e bioquímicas, foram utilizados tubos de coleta com gel ativador de coágulo para a extração de soro.

Parte do material foi entregue ao Laboratório de Desenvolvimento Analítico (LaDA) do Instituto de Química, localizado na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), para a determinação da composição isotópica do ferro dos participantes da pesquisa.

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas no Laboratório de Fisiopatologia e Bioquímica da Nutrição, no Instituto de Nutrição da UERJ.

Para realizar as análises supracitadas, foram adotados como métodos: análise de hemograma com auxílio do contador automatizado Sysmex[®] XP-300 (*Sysmex, Kobe, Japão*); método colorimétrico para a análise de ferro sérico (*Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil*) e capacidade total de ligação de ferro (*Bioclin[®], Belo Horizonte, Brasil*); método imunoenzimáticos para as análises de ferritina sérica (*Elabscience[®], Wuhan, China*); hepcidina-25 bioativa (*Elabscience[®], Wuhan, China*); proteína C reativa (*Elabscience[®], Wuhan, China*); interleucina-6 (*Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha*). Já a determinação da relação isotópica entre ⁵⁶Fe/⁵⁷Fe foi realizada por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (*Thermo Fisher Scientific iCAP[®] Qc, Bremen, Alemanha*).

O índice de saturação da transferrina foi estimado por meio do cálculo: ferro sérico/capacidade total de ligação de ferro x 100. Os valores de transferrina sérica foram calculados por meio da fórmula: capacidade total de ligação de ferro x 0,70.

4.3.2.4 Dose utilizada do isótopo ⁵⁷Fe

A capacidade de absorção de ferro foi determinada pela técnica de marcação com isótopo estável ⁵⁷Fe, no qual cada indivíduo é o seu próprio controle (KASTENMEYER et al., 1994; CHEN et al., 2005; IAEA, 2012) e a absorção calculada com base na mudança das razões isotópicas no sangue.

Para a definição da dose de ⁵⁷Fe a ser administrada, foi realizado um levantamento bibliográfico acerca da utilização deste isótopo estável em estudos com adultos saudáveis. Observou-se que nas diferentes publicações a respeito do tema, as dosagens de ⁵⁷Fe variavam entre 5 mg e 7,5 mg (VAN DEN HEUVEL et al., 1998; FIDLER et al., 2003; JUNQUEIRA-FRANCO et al., 2018).

Com base nestes dados, foi realizado um teste-piloto com o objetivo de definir a melhor dose a ser utilizada para avaliar a capacidade de absorção de ferro. Assim, dois voluntários adultos sem DF receberam diferentes doses do isótopo ⁵⁷Fe (5 mg e 7,5 mg,

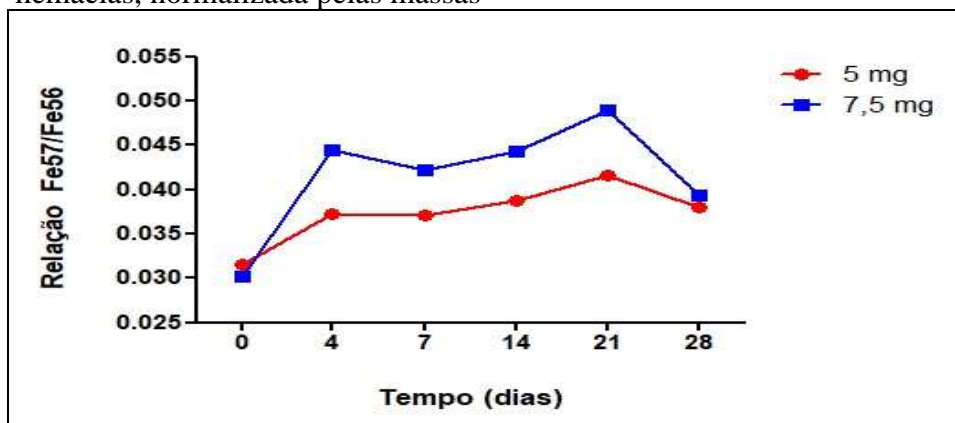
respectivamente) – sob a forma de sulfato ferroso, como será explicado posteriormente – diluídos em 100 mL de suco de laranja sem açúcar e conservantes. Cabe ressaltar que a escolha desta bebida se deve ao fato de ser rica em vitamina C, potencializando a absorção de ferro.

Para a realização do teste-piloto, cada indivíduo realizou a coleta de sangue em diferentes tempos, a fim de construir uma curva de absorção e incorporação do ferro administrado nas hemácias. Desta forma, foram coletadas amostras de sangue de cada indivíduo nos seguintes momentos: tempo zero (basal, isto é, antes da administração do isótopo), quarto, sétimo, décimo quarto, vigésimo primeiro e vigésimo oitavo dias após a ingestão do ^{57}Fe .

A cada etapa, o concentrado de hemácias de cada indivíduo foi separado para análise. Para a sua obtenção, 1 mL de sangue do tubo de heparina foi alíquotado em tubos do tipo Falcon e centrifugado durante 10 minutos a uma velocidade de $700 \times g$; posteriormente, retirou-se a camada de células brancas presentes na amostra. Ao final, adicionou-se 2 mL de ácido nítrico destilado, a fim de preservar as amostras até que fossem entregues ao LaDA.

Na figura 3, observa-se que as concentrações de 5 mg e 7,5 mg de ^{57}Fe apresentaram o mesmo padrão de comportamento. Como ambas tiveram êxito em suas análises pelo ICP-MS, optou-se pela utilização da menor concentração possível para a realização do estudo (5 mg do isótopo ^{57}Fe).

Figura 3 – Relação entre as abundâncias de $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ em uma amostra de hemácias, normalizada pelas massas



Fonte: O autor, 2019.

4.3.2.4.1 Preparo do sulfato ferroso isotopicamente marcado com ^{57}Fe

O ferro elementar enriquecido com ^{57}Fe foi adquirido por meio da empresa Cambridge Isotope Laboratories (*Cambridge Isotope Laboratories Inc, Massachusetts, EUA*).

Para o preparo do sulfato ferroso isotopicamente marcado, 24,72 mg de ^{57}Fe foram transferidos para um balão volumétrico de 10 mL e, sem seguida, adicionados 12 microlitros de ácido sulfúrico concentrado (98%) (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) e água ultrapurificada – obtida de um sistema Milli-Q[®], modelo Direct 8 (*Merck Millipore, Massachusetts, EUA*) – a fim de submergir o sólido. Esta mistura foi fechada e deixada durante 24 horas em uma atmosfera inerte e posteriormente purgada com nitrogênio, com o objetivo de manter essa atmosfera redutora, ou seja, diminuindo o potencial de oxidação deste ferro à Fe^{3+} .

Após o período de 24 horas, verificou-se que não havia mais material sólido presente e o frasco foi levado ao volume final de 10 mL, sendo utilizada novamente a água ultrapurificada. Ao final do preparo, alíquotas foram retiradas a fim de obter uma massa de ^{57}Fe de 5 mg; para isso, foram utilizados um volume de 2 mL da solução-mãe.

4.3.2.4.2 Administração do isótopo

Previamente à participação nas duas etapas do presente estudo, os voluntários foram orientados a permanecerem em jejum por um período de 10 horas.

Antes da administração do isótopo estável, foi coletada uma amostra de 30 mL sangue de cada participante para a realização das análises laboratoriais previamente descritas.

Após este primeiro procedimento, a concentração de 5 mg de isótopo estável ^{57}Fe – sob a forma de sulfato ferroso – foi diluída em 100 mL de suco de laranja sem açúcar e conservantes (marca Do Bem[®]). Padronizou-se de 100 mL de suco com o objetivo de garantir que todos os indivíduos fizessem a ingestão de um mesmo volume.

Em seguida, cada participante recebeu um pacote de 40 g de biscoito do tipo polvilho salgado, de sabor natural e sem conservantes (marca Líder de Minas[®]). Os voluntários foram orientados a não realizarem a ingestão de outros alimentos e bebidas durante o período de 2 horas após a administração do ^{57}Fe , a fim de que não houvesse qualquer interferência na absorção do isótopo.

4.3.2.4.3 Determinação da relação isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ por espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

Para determinar a relação isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$, foi utilizado 0,1g do concentrado de hemácias, diluídos em 1mL de água ultrapurificada. Deste 1 mL, 500 μL foram colocados em um frasco de micro-ondas vedado e a ele adicionados 1 mL de peróxido de hidrogênio (30%) e 1mL de ácido nítrico destilado a sub-ebulição concentrado (65% m/m).

A mistura resultante foi levada ao forno de micro-ondas, a 175 °C, por 10 minutos e posteriormente resfriada em temperatura ambiente. Após este procedimento, o conteúdo foi avolumado com água ultrapurificada até 5 mL.

Desta forma, o extrato resultante pode ser analisado pela técnica de espectrometria de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS, do inglês *inductively coupled plasma mass spectrometry*), onde as condições do equipamento são apresentadas no Quadro 1.

Quadro 1 – Parâmetros utilizados no ICP-MS para a determinação da relação isotópica

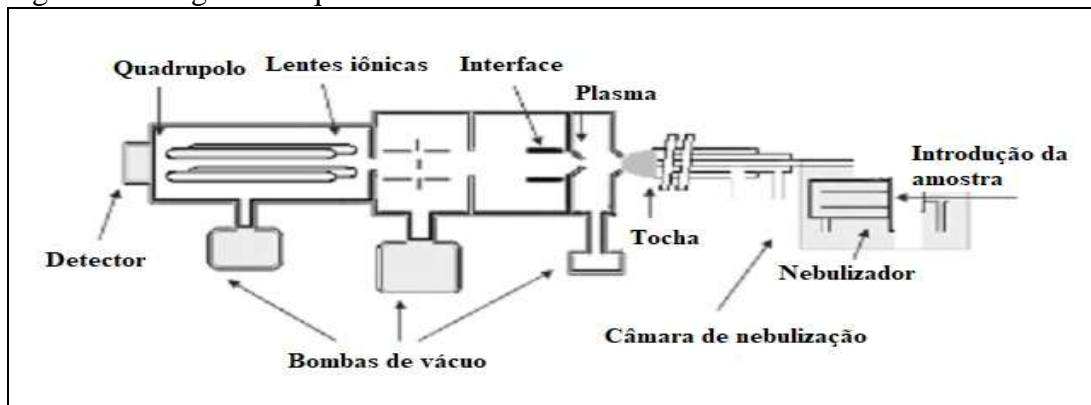
Parâmetro	ICP-MS
Potência do Plasma (W)	1550
Vazão do gás do plasma – argônio (L min ⁻¹)	14
Vazão do gás auxiliar – argônio (L min ⁻¹)	0,8
Vazão do gás do nebulizador – argônio (L min ⁻¹)	1,08
Vazão do gás de colisão – hélio (mL min ⁻¹)	5
Isótopos monitorados	⁵⁴ Fe, ⁵⁶ Fe, ⁵⁷ Fe, ⁵⁸ Fe, ⁶⁰ Ni

Fonte: O autor, 2019.

A ICP-MS é uma técnica analítica utilizada para a determinação de elementos em uma amostra, por meio de isótopos e razões isotópicas. Nesta técnica, é utilizada a espectrometria de massas de íons produzidos através de um plasma indutivamente acoplado (GINÉ-ROSIAS, 1999; AMMANN, 2007). Um espectro de massa é um gráfico do sinal do íon em função da razão massa/carga e, a partir destes espectros, a massa do íon molecular e seus fragmentos são utilizados para determinar a composição elementar ou assinatura isotópica de um composto.

Os espectrômetros de massa do tipo ICP-MS são compostos basicamente pelas seguintes seções: sistema de introdução de amostras, uma fonte de íons no extremo do aparelho, a interface (sistema para extração e focalização dos íons), um analisador de massas em sua porção central (no caso do presente trabalho, do tipo quadrupolo) e um sistema de detecção de íons (BARBOUR, 2011), como observado na Figura 4.

Figura 4 – Diagrama esquemático do ICP-MS



Fonte: Adaptado de GERVASIO e colaboradores (2003).

O sistema de introdução de amostra do ICP-MS é constituído por uma bomba peristáltica, um nebulizador e uma câmara de nebulização. A amostra (sólida ou líquida) é introduzida no nebulizador, por ação da bomba peristáltica, e convertida em um aerossol por ação de um fluxo de gás constante (o argônio). Na câmara de nebulização, as pequenas partículas de aerossol passam para o plasma, também por intermédio do gás argônio (GERVASIO et al., 2003; IAEA, 2012).

O plasma é um gás parcialmente ionizado e que contém moléculas, radicais, átomos, íons e elétrons livres (BARBOUR, 2011). É formado em um fluxo de argônio que flui por meio de três tubos concêntricos de quartzo, que constituem a tocha. Esta tocha de quartzo é posicionada concentricamente à bolina de indução, que por sua vez está acoplada a um gerador de radiofrequência. Os fluxos de argônio através da tocha mantêm o plasma, além de refrigerarem as paredes e transportar o aerossol formado anteriormente (KRUG et al., 2001; GERVASIO et al., 2003). A alta temperatura do plasma (aproximadamente 6000 °C) é capaz de ionizar a amostra (IAEA, 2012).

A interface acopla a tocha de quartzo do ICP ao espectrômetro de massa (analisador). O feixe de íons formado no plasma é extraído desta região, por diferença de pressão, e enviado para uma região de alto vácuo; o plasma gasoso atravessa o cone de amostragem para uma região de pré-vácuo, na qual há uma rápida expansão de gás, resultando em seu resfriamento. Uma fração deste gás passa através de um pequeno orifício de um segundo cone denominado *skimmer* e, posteriormente, para uma câmara em que os íons positivos são separados dos elétrons e das espécies moleculares por um potencial negativo. Finalmente, os íons gerados são focalizados por uma série de lentes magnéticas (lentes iônicas) e seguem para a entrada do analisador de massa quadrupolar (SKOOG; HOLLER, NIEMAN, 2002).

O analisador é a principal parte do instrumento, sendo responsável por separar os íons de interesse (analitos) dos outros íons, matriz e solvente. O analisador de massas quadrupolar é composto por quatro hastas condutoras paralelas em uma configuração duas a duas. A seletividade do filtro quadrupolar é estabelecida através da variação das magnitudes de voltagens de correntes alternada e contínua, ocorrendo de forma simultânea; a variação das voltagens provoca um movimento de oscilação do feixe de íons, que é posteriormente direcionado para o detector (SKOOG; HOLLER, NIEMAN, 2002; BARBOUR, 2011)

Por fim, na parte final do equipamento está localizado o detector, responsável pela contagem e armazenamento dos sinais emitidos. O detector mais utilizado nos quadrupolos é o multiplicador de elétrons secundários, no qual íons positivos colidem na superfície do eletrodo de conversão e formam elétrons secundários; assim, os elétrons gerados são

acelerados contra outros eletrodos e nesta repetição do processo o sinal é amplificado (BARBOUR, 2011). Estas correntes são digitalizadas utilizando um conversor de voltagem para frequência e transferidas para um computador, onde há o cálculo das razões isotópicas correspondentes por comparação entre as áreas de pico integradas dos sinais correspondentes a cada isótopo (CAXITO; SILVA, 2015).

Embora o ICP-MS tenha como vantagens a alta sensibilidade e a determinação de vários elementos de forma simultânea, uma desvantagem a ser citada são as interferências isobáricas de outros elementos e compostos que podem apresentar massa semelhante ao isótopo em questão, fazendo com que o analisador não consiga separá-las (CAXITO; SILVA, 2015; BRAZ, 2018).

Uma estratégia que pode ser utilizada para contornar o problema na discriminação de massas é a análise por diluição isotópica, que consiste em uma técnica analítica baseada na medida da relação isotópica de uma amostra, na qual a sua composição de isótopos sofreu alteração devido à adição de uma quantidade conhecida de um elemento que foi isotopicamente enriquecido, denominado traçador (RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ et al., 2005). No presente trabalho, utilizou-se para essa diluição 100 µL do extrato anterior e, como traçador, o ^{54}Fe (50 µL de uma solução-traçador 10 ppm de ^{54}Fe).

4.3.2.4.4 Determinação da incorporação de ferro nas hemácias e de sua absorção

Segundo a Agência Internacional de Energia Atômica, após a determinação da relação isotópica entre $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ pode-se estimar a incorporação do isótopo de ferro nas hemácias por meio de algumas equações, que tratam não só da relação obtida por meio da análise no ICP-MS, como também estimativas de volume sanguíneo e do ferro circulante em cada indivíduo (IAEA, 2012).

O primeiro cálculo realizado estima o *pool* de ferro circulante, obtido pela equação a seguir:

$$(1) \text{Ferro circulante (mg)} = \text{hemoglobina} \times \text{volume sanguíneo} \times \underline{3,47 \text{ (mg Fe)}} \times \underline{1 \text{ (L)}},$$

g hemoglobina 1000 (mL)

Onde:

A hemoglobina (g/L) é obtida por meio do sangue total do indivíduo coletado no primeiro dia de estudo;

O volume sanguíneo é comumente determinado utilizando-se o peso e altura do participante, também sendo estimado por meio de equações específicas de acordo com o sexo e idade, como será exemplificado adiante.

A quantidade de ferro presente na hemoglobina é baseada estimando-se que cada grama de hemoglobina contém uma média de 3,47 mg de ferro; multiplicando por 1/1000 pode-se converter a unidade de hemoglobina de gramas por litro para grama por mililitro, expressando todos os volumes em mililitros (mL).

Quanto ao volume sanguíneo, estabelece-se que para adultos há um volume fixo de aproximadamente 65 mL/kg de peso.

Uma vez que o volume sanguíneo é estimado, a próxima etapa é determinar a quantidade de ferro incorporado nas hemácias, utilizando a equação a seguir:

$$(2) \quad {}^{57}\text{Fe}_{\text{inc}} = \frac{R^t - R^0}{R^0} \times \text{ferro circulante (mg)} \times \frac{NA_{57\text{Fe}}}{W \text{ ferro natural}} \times m_{57\text{Fe}},$$

Onde:

${}^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}$ é a incorporação do ferro nas hemácias (em mg);

R^t é a razão ${}^{57}\text{Fe}/{}^{56}\text{Fe}$ encontrada no tempo t após a dosagem (T14);

R^0 é a razão ${}^{57}\text{Fe}/{}^{56}\text{Fe}$ encontrada no tempo basal (T0);

W ferro natural é o peso atômico médio do ferro = 55,845 mg/mmol;

$NA_{57\text{Fe}}$ é a abundância natural do isótopo ${}^{57}\text{Fe}$ = 2,1191 %;

$m_{57\text{Fe}}$ é a massa atômica do ${}^{57}\text{Fe}$ = 56,935 mg/mmol.

Por fim, calcula-se o percentual da absorção do isótopo ${}^{57}\text{Fe}$

$$(3) \quad {}^{57}\text{Fe}_{\text{absorvido}} (\%) = \frac{{}^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}}{{}^{57}\text{Fe}_{\text{dose}}} \times 100 \times 100,$$

Onde:

${}^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}$ é obtido por meio da Equação 4;

${}^{57}\text{Fe}_{\text{dose}}$ é a dose de isótopo fornecida no estudo (5 mg);

Assume-se que a incorporação de ferro nas hemácias é de 80%.

4.3.2.4 Ficha clínica da pesquisa

Após a coleta de sangue, os participantes foram entrevistados pela equipe de pesquisa, preenchendo na ficha clínica do estudo os dados pessoais de identificação, telefone para

contato, endereço e data de nascimento, bem como a cor de pele/etnia autorreferida, visando à identificação da população de estudo. Além disso, esta ficha também contempla a história clínica do indivíduo e de parâmetros relacionados às questões hematológicas, uso de medicamentos, antropometria, e perguntas a respeito do comportamento e histórico alimentar (Apêndices C e E).

Em relação às medidas antropométricas, para mensurar o peso corporal foram utilizadas balanças eletrônicas da marca Filizola® (*Filizola, modelo Personal, São Paulo, Brasil*), calibradas e com capacidade para 150 Kg. Os participantes se posicionaram em pé e no centro da balança, sem os sapatos; além disso, foi orientado que os mesmos retirem celulares, carteiras, casacos e/ou adornos que possam interferir na mensuração do peso (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988).

Já em relação à altura, os participantes foram colocados em pé, descalços ou com meias, de costas para o estadiômetro, mantendo a cabeça erguida e o corpo ereto, com os calcanhares juntos e braços estendidos ao lado do corpo. Foram utilizados estadiômetros de parede, de 2,20 metros, das marcas Tonelli® (*Tonelli, Criciúma, Brasil*) e Seca® (*Seca Brasil, Cotia, Brasil*) (LOHMAN; ROCHE; MARTORELL, 1988).

Com o intuito de classificar o estado nutricional dos participantes da pesquisa, calculou-se o índice de massa corporal (IMC), que constitui uma relação entre peso e estatura de cada indivíduo. Seus valores são determinados pela divisão do peso (em quilogramas) pelo quadrado da estatura (em metros), sendo seu valor expresso em kg/m^2 . A classificação do estado nutricional de adultos pelo IMC foi realizada utilizando-se os valores de referência propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1995), como visualizado no Quadro 2.

Quadro 2 - Valores de referência do Índice de Massa Corporal (IMC) propostos pela Organização Mundial de Saúde

Classificação	IMC (kg/m^2)
Baixo Peso	< 18,50
Adequado	18,50 – 24,99
Sobrepeso	25,00 – 29,99
Obesidade	\geq 30,00

Fonte: Adaptado de OMS, 1995.

4.3.2.5 Ressonância Magnética

A concentração hepática de ferro (LIC, do inglês *liver iron concentration*) foi avaliada por meio da realização do exame de ressonância magnética, que ocorreu no Departamento de Radiologia do Hospital Universitário Pedro Ernesto. Para avaliar a sobrecarga de ferro

hepática, utilizou-se o equipamento 1.5 Tesla Optima MR 360 (*GE Healthcare, Chicago, Estados Unidos*), usando o método T2*, já bem estabelecido para esta finalidade (ST. PIERRE et al., 2005; HANKINS et al., 2009) e sem a administração de contraste ou sedação. A realização deste exame não requer nenhum preparo. O LIC é quantificado em milimoles por grama de tecido seco ($\mu\text{mol/g}$), estando os valores normais abaixo de $40,0 \mu\text{mol/g}$ (LABRANCHE et al., 2018).

4.4 Análise estatística

A análise descritiva apresentou na forma de tabelas os dados observados, expressos pelas medidas de tendência central e de dispersão para dados numéricos – mediana e intervalo interquartil – e pela frequência (n) e percentual (%) para dados categóricos.

Foram aplicados métodos não paramétricos, pois as variáveis contínuas não apresentaram distribuição normal (Gaussiana), devido à rejeição da hipótese de normalidade segundo o teste de *Shapiro-Wilks*. O critério de determinação de significância adotado foi o nível de 5%.

A comparação das variáveis contínuas entre dois grupos foi avaliada pelo teste U de *Mann-Whitney* e, entre três subgrupos, aplicou-se a ANOVA (análise de variância) de *Kruskal-Wallis*. Já as variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado (χ^2) ou exato de Fisher.

O coeficiente de correlação de *Spearman* foi utilizado para medir o grau de associação entre as variáveis contínuas.

As análises estatísticas foram processadas pelo *software* estatístico *Statistical Package for Social Science* (IBM SPSS®, versão 22, Chicago, EUA) e os gráficos construídos pelo *software* estatístico *GraphPad Inc.*, versão 5, La Jolla, EUA).

4.5 Financiamento

O presente estudo, que integra uma das linhas de pesquisa do Centro de Referência de Nutrição à Pessoa com Doença Falciforme (NUTRIFAL), obteve financiamento a partir da Chamada Pública do CNPq/MS/SCTIE/DECIT/SAS/DAB/ CGAN, de número 13/2017, e foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES), sob o Código de Financiamento 001.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1: The effect of food and nutrients on iron overload: what do we know so far?

Submetido ao periódico “European Journal of Clinical Nutrition” em 05 de outubro de 2020 e ressubmetido em 29 de novembro de 2020 com as alterações propostas pelos revisores (ANEXO D).

The effect of food and nutrients on iron overload: what do we know so far?

Juliana Omena¹; Cíntia Curioni¹; Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues¹; Marta Citelli^{1*}

¹Nutrition Institute, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil.

***Corresponding Author:** Marta Citelli, Nutrition Institute, Rio de Janeiro State University, São Francisco Xavier Street, 524, 12144F, 20550-900, Maracanã, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: martacitelli@gmail.com

Running Title: Basis for recommending food and nutrients for patients with iron overload

ORCID:

Juliana Omena: <https://orcid.org/0000-0003-4639-1898>

Cíntia Chaves Curioni: <https://orcid.org/0000-0002-5160-9567>

Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues: <https://orcid.org/0000-0001-9497-556X>

Marta Citelli: <https://orcid.org/0000-0003-1380-3729>

Abstract

There has been no established food and nutrition guidance for diseases characterized by the presence of iron overload (IOL) yet. Hepcidin is a hormone that diminishes iron bioavailability. Its levels increase in response to increased iron stores. Hence, IOL conditions could hypothetically trigger a self-regulatory mechanism for the reduction of the intestinal absorption of iron. In addition, some food substances may modulate intestinal iron absorption and may be useful in the dietary management of patients with IOL. This scoping review aimed to systematize studies that support dietary prescriptions for IOL patients. It was carried out according to the method proposed by the Joanna Briggs Institute and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA). Although the need to restrict iron in the diet of individuals with hemochromatosis is quite clear, there is a consensus that IOL diminishes the rate of iron absorption. Reduced iron absorption is also present and

has been reported in some diseases with transfusion IOL, in which serum hepcidin is usually high. The consumption of polyphenols and 6-shogaol seems to reduce iron absorption or serum ferritin concentration, while procyanidins do not cause any changes. Vitamin C deficiency is often found in IOL patients. However, vitamin C supplementation and alcohol consumption should be avoided not only because they increase iron absorption, but also because they provoke toxic oxidative reactions when the iron is excessive. Dietary approaches must consider the differences in the pathophysiology and treatment of iron overload diseases.

5.1.1 Introduction

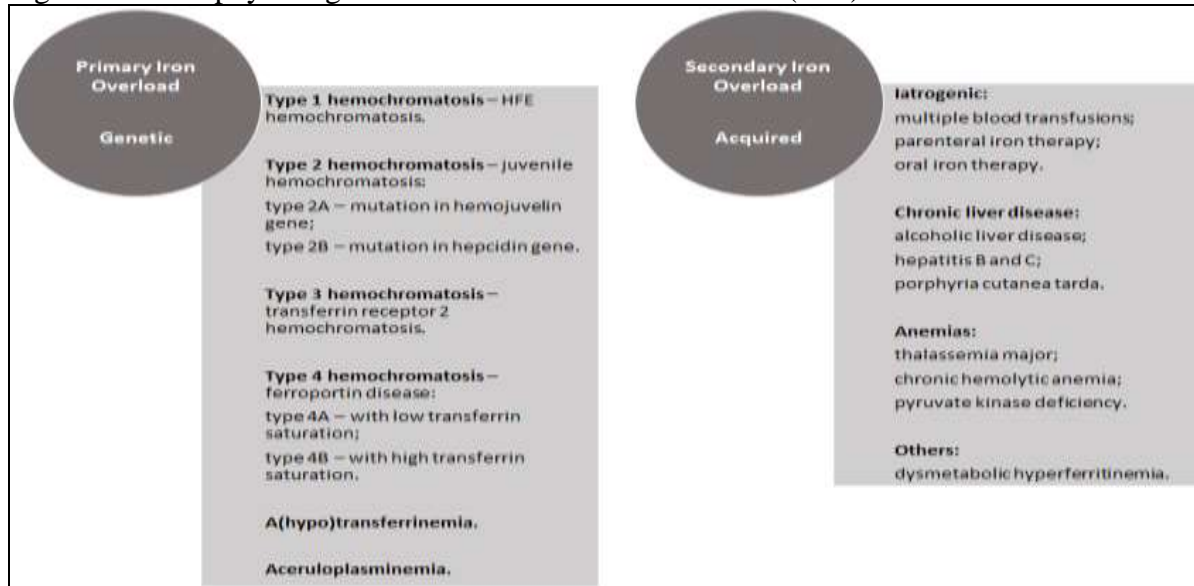
Iron, an essential mineral, participates in vital metabolic processes¹. Physiologically, it is eliminated through body secretions, peeling of the gastrointestinal tract and the epidermis, and menstrual bleeding². Iron regulation occurs by a fine mechanism, which promotes the balance between its absorption and storage and is performed by the interaction between hepcidin and ferroportin. Hepcidin is a hormone produced and secreted mainly by the liver and controls iron homeostasis, thereby reducing its bioavailability³. However, conditions that jeopardize this regulatory mechanism may also promote iron overload (IOL). The toxicity of free iron occurs due to its tendency to catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS) through Fenton reactions, which can lead to lipid peroxidation of cell membranes⁴. Individuals with IOL could show symptoms such as hepatosplenomegaly, portal fibrosis, cirrhosis, and even liver failure^{5,6}.

Depending on its origin, the IOL can be divided into primary, resulting from a deregulation of intestinal iron absorption as in hemochromatosis or secondary to other congenital or acquired conditions^{7,8} (Figure 1). Hereditary hemochromatosis (HH) is a genetic disorder that causes primary IOL and is characterized by an increase in the intestinal absorption of iron and its progressive accumulation in different organs and tissues within the body^{8,9}. The most common mutation in this type of hemochromatosis is the mutation of the homeostatic iron regulator gene (HFE; also known as 'High Fe' gene)- a gene located on the small arm of chromosome 6, which can be shown in more than one position along the amino acid chain. One of its variants is C282Y^{10,11}. Moreover, it can be caused by a mutation in transferrin receptor 2 (TfR2), hemojuvelin, or hepcidin¹¹.

Diseases associated with secondary IOL are often characterized by the presence of anemia and blood transfusion (Figure 1). In the most severe types of thalassemia, inefficient erythropoiesis is significant, and part of the accumulation of iron is due to an increase in its intestinal absorption to supply the production of new erythrocytes. In many cases, there is also the need for blood transfusions to reduce the complications presented by anemia¹². Multiple transfusions are also needed in sickle cell disease, which is a hemolytic hemoglobinopathy¹³.

In both cases, the treatment with recurrent blood transfusions leads to iron overload. Each unit of transfused blood has approximately 200–250 mg of iron, while a healthy person absorbs between 1 and 2 mg of iron per day¹⁴.

Figure 1 - Pathophysiological classification of iron overload (IOL).



Therefore, hepcidin is induced to decrease the levels of iron circulating in blood plasma and to reduce the absorption of dietary iron¹⁵. Even so, it is quite common for health professionals to recommend the restriction of the intake of iron-rich foods¹⁶. These approaches can cause a reduction in the intake and bioavailability of other minerals such as zinc, copper, and calcium as well as worsen the quality of food eaten. On the other hand, hypoxia-increased erythropoiesis and hemolysis can negatively affect the production of hepcidin^{17,18}.

Even though this issue is widely addressed in the clinical field, there is still a gap in the specialized literature on nutritional and food guidelines aimed specifically at the treatment of individuals with these diseases. Hence, this review aims to systematize the studies that support dietary prescriptions for patients with IOL.

5.1.2 Methods

This is a scoping review based on the review method proposed by the Joanna Briggs Institute (JBI)¹⁹ and the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-analyses (PRISMA)²⁰, which allow for the mapping of the concepts that are a basis for certain areas of knowledge using the different sources available and the identification of gaps in the literature. The guiding question of this article was, “What is known about the effects that food and nutrients have on diseases characterized by the presence of iron overload?”

The criteria for eligibility are summarized using the PCC format (population/participants, criteria, and context) in Table 1.

Table 1 - PCC criteria for the inclusion or exclusion of studies

Parameter	Description
Population (P)	All age groups (children, adolescents, adults, and elderly), of both sexes, with primary or secondary iron overload.
Concept (C)	Intervention studies that have assessed the influence of food or food components in iron absorption.
Context (C)	No defined context.

5.1.3 Strategy for search and selection of studies

Research was carried out using MEDLINE via Ovid, Scopus, Web of Science, and the Cochrane Library. The MeSH terms and keywords used were iron overload, hemochromatosis, hemoglobinopathies, sickle-cell disease, thalassemia, diet therapy, and nutritional treatment. The terms “and,” “or,” or “not” were used together with the keywords. The full search strategy used for MEDLINE and adapted to other databases is available in Supplemental Table S1. No data limit was established. Only studies published in English were considered.

5.1.4 Selection of studies and extraction of data

Two reviewers selected the titles and abstracts of all publications obtained by using the strategy of independent research. Furthermore, the same authors independently evaluated the full text of the potentially relevant studies to be included in this review. Any disagreements were resolved through a consensus meeting.

One of the researchers extracted the data using a spreadsheet, while the second one revised the data extracted for precision and uniformity. The following characteristics were extracted: information regarding the study (authors, country, and year of publication), characteristics of the sample (size, age, and sex), methods (design of the study, types of intervention), and the main results.

5.1.5 Types of studies

Experimental studies, including randomized and non-randomized clinical trials, quasi-experimental studies, and studies of the before/after variety were included in the study. Qualitative studies, reviews, and abstracts of conferences were excluded.

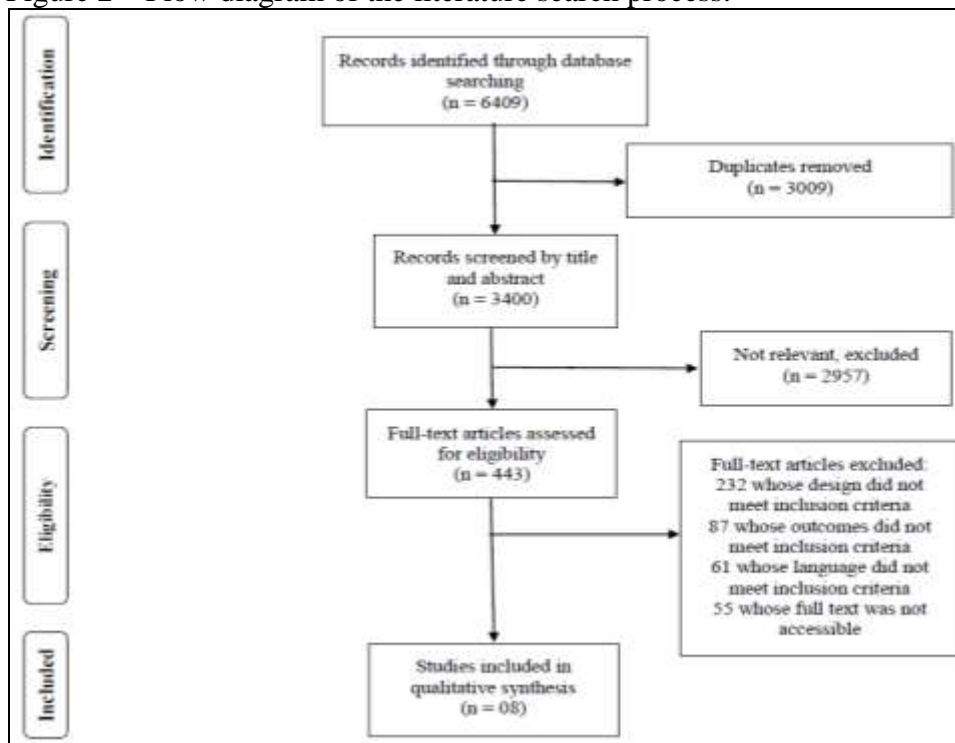
Summary of Results

The studies were grouped according to the foodstuffs or food components investigated, highlighting the population studied.

5.1.6 Results

In total, 6409 studies were recovered from the databases. After the removal of duplicates, 3400 articles were tracked based on title and abstract, and 443 were selected for sorting the whole text. Of these reports, eight met the inclusion criteria (Figure 2).

Figure 2 – Flow diagram of the literature search process.



Three studies assessed the capacity for iron absorption among patients with idiopathic hemochromatosis with IOL^{21,22,23}, as shown in Table 2. Three studies evaluated the effect of the use of black tea²⁴ or antioxidants such as procyanidins²⁵ and 6-shogaol²⁶ on iron absorption under overload conditions. Two studies evaluated the effects on the iron status after vitamin C supplementation in β -thalassemia patients^{27,28}. These studies will be presented herein according to the foodstuffs or food components investigated.

Table 2 – Study Characteristics

NUTRIENT OR SUBSTANCE	AUTHOR	STUDY POPULATION	METHODS	BASELINE IRON STATUS	IRON ABSORPTION	OUTCOMES
VITAMIN C						
Vitamin C	Elalfy et al. (2015) ²⁷	β -thalassemia major patients with vitamin C deficiency (n = 180): Group A: Supplementation with vitamin C (n = 90) Group B: No supplementation (n = 90)	Randomized prospective trial who aimed to investigate the effects of vitamin C as an adjuvant therapy to three used iron chelators (DFO, DFP, DFX) in moderately iron overload young patients. All patients received were followed up for 1 year with assessment of iron profile, LIC and cardiac MRI T2*.	<i>Group A (vitamin C):</i> Serum iron (mean) = 189.73 μ g/dL TIBC (mean) = 260.23 μ g/dL SF (median) = 1,710 μ g/dL TS (mean) = 68.57 % LIC (mean) = 9.57 mg/gm Cardiac T2* (mean) = 14.63 msec <i>Group B (no vitamin C):</i> Serum iron (mean) = 189.5 μ g/dL TIBC (mean) = 256.2 μ g/dL SF (median) = 1,690 μ g/dL TS (mean) = 71.2 % LIC (mean) = 9.4 mg/gm Cardiac T2* (mean) = 14.9 msec	NA	After vitamin C therapy, SF, serum iron, TS and LIC were significantly decreased in group A patients, while cardiac MRI T2* was elevated compared to those in group B (without vitamin C). Vitamin C possibly potentiates the efficacy of DFO more than DFP and DFX in reducing iron burden in the moderately iron overloaded vitamin C deficient patients with thalassemia with no adverse events.
Vitamin C	Chapman et al. (1982) ²⁸	Patients with β -thalassemia major with transfusional iron overload (n = 61): Ascorbic acid deficient patients (n = 21) Ascorbic acid replete patients (n = 6)	Follow-up SF, iron and TS were performed within six months of starting subcutaneous DFO and oral ascorbic acid therapy in 21 initially ascorbic acid deficient and 6 initially acid ascorbic replete patients. Liver biopsies were performed in 44 patients and LIC was measured. Repeated liver biopsies were performed in 12 patients who were initially ascorbic acid deficient after treatment with DFO and ascorbic acid therapy.	<i>Ascorbic acid deficient patients:</i> Serum iron = 26 - 48 μ mol/L TS = 44 - 106 % SF = 1,740 - 24,000 μ g/L LIC = 1,080 - 10,560 μ g/100 mg dry wt <i>Ascorbic acid replete patients:</i> Serum iron = 33 - 44 μ mol/L TS = 59 - 116 % SF = 2,000 - 15,200 μ g/L LIC = 780 - 7,228 μ g/100 mg dry wt	NA	When ascorbic acid deficient patients were treated, serum iron and TS rose significantly; SF rose in 13 of 21 patients despite the DFO therapy. In contrast, all iron measurements tended to fall in ascorbic acid replete patients with ascorbic acid and DFO therapy. Thus, ascorbic acid deficiency may give rise to inappropriate SF concentrations in relation to body iron stores.
ANTIOXIDANTS						
Black tea	Kaltwasser et al. (1998) ²⁴	HH homozygous for C282Y mutation patients (n = 18): Patients above Reference SF Range (n = 2)	Intestinal iron absorption from a test meal was measured by using whole body counting. Body iron stores were evaluated quantitatively by exhaustive phlebotomy, using iron parameters for the assessment of body iron status. Duration: 52 weeks.	<i>Tea group :</i> iron mobilized = 1.4 - 23.6 g serum iron = 14.9 - 42.3 μ mol/L TS = 30 - 95 % SF = 61 - 254 μ g/L <i>Water group:</i> iron mobilized = 2.4 - 23.2 g serum iron = 15.9 - 41.6 μ mol/L TS = 30 - 87% SF = 63 - 600 μ g/L	Test meal with tea (mean) = 6.9 % Test meal with water (mean) = 22.1 %	A significant reduction in iron absorption was observed when the test meal was accompanied by tea instead of water. In the tea group, the increase in storage iron was reduced by about one third compared with that of the control group. Regular tea drinking with meals reduces the frequency of phlebotomies.
Procyanidins	Lobbes et al. (2020) ²⁵	HH homozygous for C282Y mutation patients (n = 20) DIOS patients (n = 20)	Basal serum iron level was measured following an overnight fast. Each patient consumed a standardized test iron-rich meal with 2 capsules of placebo or procyanidin supplementation. The patients attended for 3 visits. Each period was separated by a 3-day wash-out period.	<i>HH:</i> SF = 54 μ g/L HIC = NA <i>DIOS:</i> SF = 508 μ g/L HIC = 83 μ mol/g	Iron absorption was 3.5-fold higher in HH than in DIOS.	Procyanidin supplementation did not significantly modify iron absorption in DIOS or in HH.

6-shogaol	Golombick et al. (2017) ²⁶	MS patients (n = 6): SF ≥ 1000 µg/L (n=1) Above Reference SF Range (n=2)	One gel capsule daily containing 20 mg ginger extract standardized for 20% 6-shogaol were administered for 6 months. Blood and urine samples were collected and monitored at regular intervals. The study was repeated on 2 of 3 patients for a further 6 months (with a wash-out period of 3 months).	SF = 94 - 2,195 µg/L TIBC = 37 - 56 µmol/L Serum iron = 10.7 - 29.5 µmol/L	NA	6-shogaol caused a decrease in SF levels in 3 of 6 patients (50%), whose SF levels were elevated at the start of the study.
IRON						
Iron	Bezwdoda et al. (1976) ²¹	Iron deficient patients SF < 25µg/L (n = 18) Iron deficient women SF < 25µg/L (n = 12) Treated IH patients SF < 25µg/L (n = 8) Untreated IH patients SF ≥ 1,000 µg/L (n = 4)	The absorption of radioactive iron from a solution of ferrous ascorbate, and from a standard meal containing intrinsically labeled hemoglobin and wheat (Fe-55 and Fe-59), was measured in iron deficient women, iron deficient hospital patients and subjects with IH.	<i>Iron deficient hospital patients</i> SF < 25µg/L: Serum iron = 3.6 - 10.4 µmol/L TS = 5 - 16 % <i>Iron deficient women</i> < 25 µg/L: Serum iron: 5.5 - 21.1 µmol/L TS = 8 - 32 % <i>Treated IH patients</i> SF < 25µg/L: Serum iron = 7 - 19.1 µmol/L TS = 8 - 34 % <i>Untreated IH patients</i> SF > 1,000 µg/L: Serum iron = 43.6 - 61.1 µmol/L TS = 90 - 94 %	<i>Iron deficient hospital patients</i> SF < 25µg/L: Heme food iron = 12.8 - 60.9 % Nonheme food iron = 3.9 - 56.4 % Ferrous ascorbate = 16.8 - 80.3 % <i>Iron deficient women</i> < 25 µg/L: Heme food iron = 16.8 - 47.6 % Nonheme food iron = 0.1 - 22.3 % Ferrous ascorbate = 12.9 - 93.1 % <i>Treated IH patients</i> SF < 25µg/L: Heme food iron = 30.7 - 46 % Nonheme food iron = 16.8 - 62.4 % Ferrous ascorbate = 58.4 - 95.4 % <i>Untreated IH patients</i> SF > 1,000 µg/L: Heme food iron = 3.7 - 30.6 % Nonheme food iron = 0.1 - 20.3 % Ferrous ascorbate = 8.6 - 13 %	There were no significant differences between the absorptions of ferrous ascorbate or of the heme iron in the standard meal by each group, but iron deficient women and iron deficient hospital patients absorbed significantly less of the nonheme food iron than IH patients.
Iron	Lynch, Skikne, Cook (1989) ²²	Control subjects (n = 75) IH patients SF ≥ 1,000 µg/L (n = 7) IH patients SF < 1,000 µg/L (n = 8): Patients above SF range (n = 2) Heterozygotes relatives of IH patients (n = 22)	The relationship between iron status and food iron absorption was evaluated by using double extrinsic radioiron tags (Fe-55 and Fe-59) to label independently the nonheme and heme iron components of a hamburger meal. In some studies, this meal was fortified with iron and modified to improve bioavailability of the nonheme iron fraction.	<i>Control subjects</i> : SF Normal men = 100 µg/L SF Normal women = 30 µg/L SF Iron deficiency = 10 µg/L <i>IH patients</i> SF ≥ 1,000 µg/L: Serum iron = 174 - 240 µg/dL TS = 76 - 100 % <i>IH patients</i> SF < 1,000 µg/L: Serum iron = 30 - 215 µg/dL TS = 7 - 100 % <i>Heterozygotes Relatives</i> : Serum iron = 22 - 223 µg/dL TS = 8 - 74 % SF = 7 - 221 µg/L	<i>Control subjects</i> : Normal men nonheme = 2.5 %; heme = 20.6 % Normal women nonheme = 7.7 %; heme = 31.6 % <i>Iron deficiency</i> nonheme = 21.5 %; heme = 46.8 % <i>IH patients</i> : SF ≥ 1,000 µg/L - nonheme = 1.4 - 32.9 %; heme = 11 - 77.3 % SF < 1,000 µg/L nonheme = 1.6 - 57 %; heme = 16.8 - 84.2 % <i>Heterozygotes Relatives</i> : Nonheme standard meal = 1.4 - 23.3 % Nonheme fortified meal = 1.7 - 39.6 %	These studies confirm the presence of excessive nonheme iron absorption even from unfortified meals in IH patients and suggest in addition that they are particularly susceptible to iron loading from diets containing a high proportion of heme iron.

Iron	Milder, Cook, Finch (1978) ²³	<p><i>Iron deprivation study:</i> Normal subjects (n = 2) Untreated IH patients SF \geq 1,000 $\mu\text{g/L}$ (n = 2) Treated IH patients (n = 3)</p> <p><i>Iron Supplementation study:</i> Normal subjects (n = 20) Iron depleted subjects (n = 5) IH patients (n = 6)</p>	<p><i>Iron deprivation study:</i> Subjects were followed for 7 days on an unrestricted regular diet. They were then given a low iron diet for 7 days followed by a return to their normal diet. The low diet consisted on infant formula without iron. Plasma iron was determined at 12-hour intervals during the study, and TS was measured at weekly intervals. <i>Iron Supplementation study:</i> All subjects took their usual diet during the 7-day study. On days 3 through 5, a solution of ferrous sulfate was swallowed during each of 3 meals in doses ranging from 7.5 to 45 mg/meal. Plasma iron was measured each day 2-3h after te evening meal and other times in selected studies.</p>	<p><i>Iron deprivation study:</i> Normal subjects Plasma iron = 125 - 159 $\mu\text{g/dL}$ TS = 41 - 43% SF = 55 - 72 $\mu\text{g/L}$ Untreated IH patients Plasma iron = 234 - 267 $\mu\text{g/dL}$ TS untreated IH patients = 92 - 95 % SF untreated IH patients = 1,770 – 3,400 $\mu\text{g/L}$ Treated IH patients Plasma iron = 204 - 294 $\mu\text{g/dL}$ TS treated IH patients = 79 - 98 % SF treated IH patients = 23 - 470 $\mu\text{g/L}$</p> <p><i>Iron Supplementation study:</i> Normal subjects Plasma iron = 54 - 188 $\mu\text{g/dL}$ TS = 15 - 56% SF = 20 - 220 $\mu\text{g/L}$ Iron depleted subjects Plasma iron = 21 - 65 $\mu\text{g/dL}$ TS iron = 6 - 18 % SF iron = 1 - 14 $\mu\text{g/L}$ IH patients Plasma iron = 49 - 139 $\mu\text{g/dL}$ TS = 17 - 52 % SF = 19 - 290 $\mu\text{g/L}$</p>	NA	<p>These studies indicate that iron absorption is an important determinant of the elevated plasma iron in IH and that the plasma iron tolerance test combined with serum ferritin may be used to detect excessive absorption of iron. In normal subjects, absorbed iron does not influence the plasma level unless iron stores are depleted or intake is greatly augmented.</p>
------	--	---	--	---	----	---

Abbreviations: HH, Hereditary Hemochromatosis; SF, Serum Ferritin (Reference Range: 10 – 300 $\mu\text{g/L}$); DIOS, Dysmetabolic Iron Overload Syndrome; MS, Myelodysplastic Syndrome; IH, Idiopathic Hemochromatosis; DFO, Deferoxamine; DFP, Deferiprone; DFX, Deferasirox; TS, Transferrin Saturation; HIC/LIC, Hepatic Iron Concentration; TIBC, Total Iron-Binding Capacity; NA, not available or non-applicable.

5.1.6.1 Iron

Three studies evaluated the capacity of iron absorption in patients with hemochromatosis and IOL^{21,22,23}. Considering that iron deficiency is known to increase the iron absorption capacity, Bezwoda et al.²¹ evaluated the iron absorption capacity of patients with idiopathic hemochromatosis (eight patients with ferritin levels < 25 µg/L due to phlebotomy and four patients with ferritin concentrations > 1000 µg/L) and compared it with the iron absorption capacity of iron-deficient participants (12 women and 18 hospitalized patients, all with ferritin levels < 25 µg/L). Initially, the participants received standardized meals tagged with iron radioisotopes: a slice of bread intrinsically tagged with ⁵⁵Fe and a lamb hamburger (prepared with the inclusion of ⁵⁹Fe-heme). After two weeks, blood samples were collected to establish the absorption and iron parameters. A new test was carried out, and a solution containing 30 mg of ascorbic acid and 3 mg of iron (⁵⁹Fe) was given. Absorption of heme iron was similar between groups, but the absorption of non-heme iron was significantly higher among participants with hemochromatosis, corroborating the results observed in another study by Walters et al.²⁹.

In a similar study, Lynch, Skikne, and Cook²² assessed the relationship between iron status and food iron absorption by using double extrinsic radioiron tags to independently label the nonheme and heme iron components of a hamburger meal. The study was conducted in patients with idiopathic hemochromatosis (n = 15, of whom 7 showed ferritin levels > 1000 µg/L and n = 2 with ferritin levels > 300 µg/L) and their heterozygous parents (n = 22, of whom 2 had iron deficiency, with ferritin levels < 12 µg/L) as well as 75 controls without the mutation (including 7 people with iron deficiency and 4 with anemia). The non-heme iron absorption of participants with IOL and hemochromatosis was inversely correlated with storage iron. These studies^{21,22} confirmed the presence of excessive non-heme iron absorption even from unfortified meals in patients with idiopathic hemochromatosis and suggested that they are particularly susceptible to iron loading from diets containing a high proportion of heme iron since heme iron absorption was not controlled by iron storage.

The relationships between food iron absorption, iron stores, and plasma iron levels were also studied by Milder, Cook, and Finch²³. The results indicated that iron absorption was an important determinant of elevated plasma iron in idiopathic hemochromatosis, which was a remarkable finding for that time. The non-heme iron absorption of participants with IOL and hemochromatosis was inversely correlated with storage iron.

5.1.6.2 Vitamin C

Elalfy et al.²⁷ investigated the effects of vitamin C as supportive therapy for the use of iron chelators in 180 young people (<18 years old) with β -thalassemia major and moderate IOL. The groups were divided according to the use of chelators deferoxamine (DFO), deferiprone (DFP), and deferasirox (DFX) and, subsequently, in subgroups according to vitamin C supplementation. Group A received 100 mg daily for 1 year, and group B was composed of non-supplemented individuals. During the study, participants consumed a low-iron diet (11-15 mg of iron per day) and a standard diet with vitamin C. After 1 year of supplementation and chelation therapy, there was a decrease in the transfusion rate as well as in the concentrations of ferritin, serum iron, transferrin saturation, and hepatic iron content (LIC). In contrast, there was an increase in vitamin C and hemoglobin levels. Patients treated with DFO and vitamin C had higher concentrations of hemoglobin and ascorbic acid and lower levels of serum iron, ferritin, and transferrin saturation compared to those in the other two subgroups, presenting greater effectiveness in reducing IOL.

Chapman et al.²⁸ also evaluated the effect of vitamin C supplementation in people with β -thalassemia major and IOL. Of the 61 participants, 64% had low levels of leukocyte ascorbic acid, with no evidence of scurvy. When supplemented with vitamin C (200 mg daily) and using DFO, 13 of 21 participants with vitamin C deficiency showed an increase in serum ferritin, in addition to an increase in serum iron and transferrin saturation, indicating greater iron circulation between tissues. However, in the group with adequate levels of vitamin C, these three markers tended to decrease. These findings suggest that the responses to vitamin C supplementation depended on the vitamin C nutritional status.

5.1.6.3 Other Antioxidants

A study evaluated the effect of black tea on the absorption and accumulation of iron in patients with hereditary hemochromatosis (homozygous for C282Y) and IOL²⁴. The absorption test was based on the addition of a radioactive isotope directly to the food to be evaluated, thereby evaluating the iron bioavailability³⁰. Iron absorption was tested using a standard meal enriched with ⁵⁹Fe provided with 200 mL of black tea of the Wewesse Ceylon Broken variety²⁴ or water. The addition of tea to the meals reduced the absorption of iron from 22.1% to 6.9% (a reduction of about 70%). After 52 weeks, regular tea drinking with meals reduced the frequency of phlebotomies required in the management of patients with

haemochromatosis²⁴. Regarding the storage iron, there were no statistical differences between the groups.

The use of tea with meals was also investigated by De Alarcon et al.³¹ in patients with thalassemia major and the intermediate form who did not show signs of IOL. After performing tests with ⁵⁹Fe in an apple jam together with a standard meal, accompanied by 240 mL of water or black tea, the effects of tea as an inhibitor of dietary iron could be observed since the percentage of iron absorption significantly decreased (varying from 41% to 95% inhibition). Both studies suggested that the consumption of tea during meals may be recommended as an additional therapy to reduce the intestinal absorption of iron along with phlebotomies^{24,31}.

Apart from the use of tea, a study that assessed the effect of the consumption of procyanidins was identified²⁵. Procyanidins are oligomers of catechin and epicatechin, which are the most important polyphenols found in the infusion of black tea, cocoa, and red wine. A randomized double-blind clinical trial was performed with hereditary hemochromatosis (homozygous for the C282Y mutation; n = 20) or DIOS (Dysmetabolic IOL Syndrome; n = 20) participants. The main goal was to establish whether supplementation with 100 mg of procyanidins (2 capsules of Oligopin[®], an extract from the pine tree) during meals could reduce the intestinal absorption of iron. The isolated use of the supplement of procyanidins did not inhibit iron absorption, unlike the previous reports which evaluated the effects of black tea consumption. The authors believe that the availability of polyphenol to chelate nonheme iron could have been counteracted by the proportion of heme-iron in their meal. The formation of a polyphenol-iron complex in the intestinal tract is believed to limit iron absorption. Furthermore, the 100 mg of procyanidin could have been a low dosage to make a significant impact on the amount of iron absorbed.

The effect of 6-shogaol, a substance of ginger with antioxidant and hepatoprotective effects^{32,33} was established²⁶. Six participants with myelodysplastic syndromes received 20 mg of ginger extract per day. Blood samples were collected for 6 months, and it was observed that 50% of the IOL individuals (n = 3) showed a reduction of iron ferritin of more than 40%.

5.1.6.4 Alcohol

Although the association between excessive alcohol consumption and IOL was well described by observational studies^{34,35}, no intervention studies were identified by the present

search. However, existing studies should be highlighted because, indirectly, they provide clues about the nutritional care that may be assumed for IOL patients.

The high iron absorption observed in patients who consume alcohol can be attributed to the reduction of the transcription of the gene encoding hepcidin. In both *in vitro* and *in vivo* studies carried out by Harrison-Findik et al.³⁶, alcohol was able to promote a reduced expression of hepatic hepcidin, in turn leading to an increased divalent metal transporter-1 (DMT-1) and ferroportin in the duodenum in mice. The concentrations of ferritin, transferrin saturation, and serum iron are usually high among people who consume alcoholic beverages, compared to those who do not^{37,38,39}. Fletcher et al.⁴⁰ found higher concentrations of hepatic iron in people with hereditary hemochromatosis (homozygous for the C282Y mutation on gene HFE) who had a high consumption of alcohol. Similar results were found in the study by Scotet et al.⁴¹, in which the high consumption of alcoholic beverages led to increased severity of hereditary hemochromatosis, with high concentrations of iron markers (serum iron, ferritin, and transferrin saturation levels) and clinical signs of worsening of the overload, such as an enlarged liver, arthritis, metabolic disorders, fatigue, and skin pigmentation.

5.1.7 Discussion

To our knowledge, this scoping review is the first to coalesce evidence about the effects that food and nutrients may have on diseases characterized by the presence of IOL.

Vitamin C is a modulator of iron metabolism and is involved in the supply of electrons to duodenal cytochrome b561 (DCYTB), which facilitates the transport of iron by the divalent metal transporter-1 (DMT-1)⁴². Furthermore, vitamin C inhibits hepcidin expression in HepG2 cells⁴³. Although the contribution of vitamin C to the prevention of iron deficiency anemia in people with low iron stores is widely known, little is known about the effects of supplementation and/or ingestion of high doses of ascorbic acid in individuals with IOL. As presented in two studies included in this review^{27,28}, the use of iron chelators together with vitamin C supplementation may potentiate the efficacy of the iron chelator DFO in reducing the iron burden in β -thalassemia patients with moderate IOL.

Previous studies with DFO have observed that vitamin C supplementation increased the effectiveness of DFO and increased urinary iron excretion^{44,45}. However, a significant increase in the deposit of myocardial iron was observed in the group supplemented with vitamin C²⁷. The authors emphasize that the use of these supplements should be performed with caution. It is important to note that the benefits of this supplementation in diseases that

present transfusion IOL seem to happen only when there is the concomitant use of iron chelators. Therefore, iron metabolism markers should always be carefully analyzed.

It is known that, in the presence of IOL, vitamin C deficiency is common^{46,47}. The possibility that IOL may play an important role in the deficiency of this vitamin was first observed by Schulz and Swanepoel⁴⁸, who noticed a low urinary excretion of ascorbic acid in two Bantu men with severe siderosis, even after prolonged administration of vitamin C. The same was observed in a study by Lynch et al.⁴⁹, in which three Bantu men with IOL showed less urinary excretion of vitamin C and greater excretion of oxalic acid compared to the controls. Therefore, ascorbic acid is believed to be oxidized irreversibly due to massive iron deposits in tissues^{48,49} and should be carefully recommended in the presence of IOL. Eating natural sources of this vitamin may be safer than using supplements.

Researchers have been studying the influence of other antioxidants on iron intestinal absorption. Currently, many antioxidants are known to regulate this absorption, either through iron chelation or through modulation of the expression of regulator genes⁵⁰. Polyphenols are also well-known chelation agents that present in a wide range of foodstuffs and drinks, including grains, tea, coffee, cocoa, and red wine. Of these, black tea is known to be a powerful inhibitor of iron absorption, although there has been little investigation about its benefits in IOL diseases²⁴.

The effect of using tea on iron absorption was assessed in hereditary hemochromatosis, as shown here in this review. However, in diseases with secondary IOL, these effects have not been evaluated. It is plausible that in secondary IOL, the use of these chelating substances would not be necessary due to the mechanism of control of iron absorption promoted by hepcidin. The results of these studies^{21,22,23} suggested that in the case of hemochromatosis, both heme and non-heme iron should be avoided since iron absorption is not properly regulated in this disease.

Even so, different pathophysiological mechanisms should be considered. While it is normal to carry out phlebotomy to reduce the excess quantity of iron in hemochromatosis, in other diseases such as myelodysplastic syndrome, thalassemia, and sickle cell anemia, the main cause of IOL are the regular blood transfusions. These different mechanisms influence how iron is stored and mobilized in the body, possibly influencing dietary recommendations.

Few studies^{51,52} were carried out to investigate iron absorption among people with sickle cell disease. These studies did not distinguish the presence or absence of IOL. However, the results suggested a possible increase in intestinal absorption of iron in sickle cell disease patients. Based on the studies of Omena et al.⁵³ and Mangaonkar et al.⁵⁴,

individuals with the highest levels of ferritin also showed the highest concentrations of serum hepcidin, which suggests lower absorption of iron. However, new studies investigating iron absorption should be carried out on patients with sickle cell disease and other secondary IOL diseases, considering the presence of IOL.

Considering the scarcity of randomized clinical trials and the small sample size adopted by the studies, it was not possible to summarize specifically suggested dosages of the substances analyzed in this review. Additionally, another potential limitation of this review is that the results of most studies focus mainly on IOL in hemochromatosis or β -thalassemia.

5.1.7 Conclusion

The review mapped existing studies on the absorption of dietary iron in different diseases that occur with IOL. Although the need to restrict iron in the diet of people with hemochromatosis is quite clear, there is a consensus that IOL diminishes its absorption. The consumption of antioxidants can be considered as auxiliary therapy. In this regard, the amount around a cup of black tea seems to be more efficient than the use of its components separately. Additionally, vitamin C supplementation and alcohol consumption should be avoided not only because they increase iron absorption, but also because they provoke toxic oxidative reactions when the iron is excessive. However, vitamin C may be beneficial for vitamin deficient patients with β -thalassemia who present with IOL and are undergoing chelation therapy. A clear dietary approach to be followed in each disease that is associated with iron overload needs to be better explored, especially considering the differences in their pathophysiology and treatment.

Acknowledgments: The authors thank the Brazilian Ministry of Health for encouraging scientific research on sickle cell disease between 2010 and 2014.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

Financial Support: This study was funded by the Ministry of Health (process# 777022/2012), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (process# 408401/2017-6); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001).

Authorship: JO participated in the conception and design of the study and wrote the first draft of the manuscript. MC developed the concept and design of this study, supervised the writing of the manuscript, and revised the final version. CC and CSCR critically revised the manuscript and contributed to the writing of the manuscript. All authors were involved in the review and approved the final version of the manuscript.

5.1.8 References

- 1 McDermid JM, Lönnerdal B. Iron. *Adv Nutr* 2012; **3**: 532-533. doi: 10.3945/an.112.002261
- 2 Green R, Charlton R, Seftel H, Bothwell T, Mayet F, Adams B et al. Body Iron Excretion in Man: A Collaborative Study. *Am J Med* 1968; **45**: 336-353. doi: 10.1016/0002-9343(68)90069-7
- 3 Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 1434-1443. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014
- 4 Ward R. An update on disordered iron metabolism and iron overload. *Hematology* 2010; **15**: 311-317. doi: 10.1179/102453310X12647083621164
- 5 Darbari DS, Kple-Faget P, Kwagyan J, Rana S, Gordeuk VR, Castro O. Circumstances of Death in Adult Sickle Cell Disease Patients. *Am J Hematol* 2006; **81**: 858-863. doi: 10.1002/ajh.20685
- 6 Piperno A, Pelucchi S, Mariani R. Inherited iron overload disorders. *Transl Gastroenterol Hepatol* 2020; **5**: 25. doi: 10.21037/tgh.2019.11.15
- 7 Piperno A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica* 1998; **83**: 447-455.
- 8 Bacon BR, Adams PC, Kowdley KV, Powell LW, Tavill AS. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology* 2011; **54**: 328-343
- 9 Brandhagen DJ, Fairbanks VF, Baldus W. Recognition and Management of Hereditary Hemochromatosis. *Am Fam Physician* 2002; **65**: 853-860.
- 10 Tavill AS, American Association for the Study of Liver Diseases, American College of Gastroenterology; American Gastroenterological Association. Diagnosis and Management of Hemochromatosis. *Hepatology* 2001; **33**: 1321-1328. doi: 10.1053/jhep.2001.24783
- 11 Powell LW, Seckington RC, Deugnier Y. Haemochromatosis. *Lancet* 2016; **388**: 706-716. doi: 10.1016/S0140-6736(15)01315-X

- 12 Rachmilewitz EA, Giardina PJ. How I treat thalassemia. *Blood* 2011; **118**: 3479-3488. doi: 10.1182/blood-2010-08-300335
- 13 Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010; **376**: 2018-2031. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X
- 14 Giardina PJ, Grady RW. Chelation therapy in beta-thalassemia: the benefits and limitations of desferrioxamine. *Semin Hematol* 1995; **32**: 304-312.
- 15 Ganz T, Nemeth E. Iron imports. IV. Hepcidin and regulation of body iron metabolism. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006; **290**: G199-203. doi: 10.1152/ajpgi.00412.2005
- 16 Ohemeng A, Boadu I. The role of nutrition in the pathophysiology and management of sickle cell disease among children: A review of literature. *Crit Rev in Food Sci Nutr* 2018; **58**: 2299-2305. doi: 10.1080/10408398.2017.1319794
- 17 Ganz T. Hepcidin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology Am Soc of Hematol Educ Program* 2006; **507**: 29-35. doi: 10.1182/asheducation-2006.1.29
- 18 Kaitha S, Bashir M, Ali T. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2015; **6**: 62-72. doi: 10.4291/wjgp.v6.i3.62
- 19 Peters MDJ, Godfrey C, McInerney P, Munn Z, Tricco AC, Khalil H. Chapter 11: Scoping Reviews (2020 version). In: Aromatari Es and Munn Z (editors). *JBI Manual for Evidence Synthesis*. JBI, 2020. Available online: <https://synthesismanual.jbi.global> (accessed on June 7, 2020).
- 20 Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med* 2009; **6**: e1000097. doi: 10.1371/journal.pmed.1000097
- 21 Bezwoda WR, Disler PB, Lynch SR, Charlton RW, Torrance JD, Derman D et al. Patterns of food iron absorption in iron-deficient white and indian subjects and in venesected haemochromatotic patients. *Br J Haematol* 1976; **33**: 425-436. doi: 10.1111/j.1365-2141.1976.tb03560.x
- 22 Lynch SR, Skikne BS, Cook JD. Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood* 1989; **74**: 2187-2193.
- 23 Milder MS, Cook JD, Finch CA. Influence of food iron absorption on the plasma iron level in idiopathic hemochromatosis. *Acta Haematol* 1978; **60**: 65-75. doi:10.1159/000207699
- 24 Kaltwasser JP, Werner E, Schalk K, Hansen C, Gottschalk R, Seidl C. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut* 1998; **43**: 699-704. doi: 10.1136/gut.43.5.699
- 25 Lobbes H, Gladine C, Mazur A, Pereira B, Dualé C, Cardot JM. Effect of procyanidin on dietary iron absorption in hereditary hemochromatosis and in dysmetabolic iron overload

- syndrome: A crossover double-blind randomized controlled trial. *Clin Nutr* 2020; **39**: 97-103. doi: 10.1016/j.clnu.2019.02.012
- 26 Golombick T, Diamond TH, Manoharan A, Ramakrishna R, Badmaev V. Effect of the ginger derivative, 6-shogaol, on ferritin levels in patients with low to intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome – a small, investigative study. *Clin Med Insights Blood Disord* 2017; **10**: 1179545X17738755. doi: 10.1177/1179545X17738755
- 27 Elalfy MS, Saber MM, Adly AAM, Ismail EA, Tarif M, Ibrahim F et al. Role of vitamin C as an adjuvant therapy to different iron chelators in young β -thalassemia major patients: efficacy and safety in relation to tissue iron overload. *Eur J Haematol* 2015; **96**: 318-326. doi: 10.1111/ejh.12594
- 28 Chapman RW, Hussain MA, Gorman A, Laulicht M, Politis D, Flynn DM et al. Effect of ascorbic acid deficiency on serum ferritin concentration in patients with β -thalassemia major and iron overload. *J Clin Pathol* 1982; **35**: 487-91. doi: 10.1136/jcp.35.5.487
- 29 Walters GO, Jacobs A, Worwood M, Trevett D, Thomson W. Iron absorption in normal subjects and patients with idiopathic haemochromatosis: Relationship with serum ferritin concentration. *Gut* 1975; **16**: 188-192. doi: 10.1136/gut.16.3.188
- 30 International Atomic Energy Agency (IAEA). *Assessment of iron bioavailability in humans using stable iron isotope techniques*. IAEA Human Health Series no 21 (International Atomic Energy Agency, Austria, 2012).
- 31 De Alarcon PA, Donovan ME, Forbes GB, Landaw AS, Stockman 3rd JA. Iron absorption in the thalassemia syndromes and its inhibition by tea. *N Engl J Med* 1979; **300**: 5-8. doi: 10.1056/NEJM197901043000102
- 32 Alqasoumi S, Yusufoglu H, Farraj A, Alam A. Effect of 6-shogaol and 6-gingerol on diclofenac sodium induced liver injury. *Int J Pharmacol* 2011; **7**: 868-873. doi: 10.3923/ijp.2011.868.873
- 33 Zhuang X, Deng ZB, Mu J, Zhang L, Yan J, Miller D et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *J Extracell Vesicles* 2015; **4**: 1-18. doi: 10.3402/jev.v4.28713
- 34 Bell H, Skinningsrud A, Raknerud N, Try K. Serum ferritin and transferrin saturation in patients with chronic alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *J Inter Med* 1994; **236**: 315-322. doi: 10.1111/j.1365-2796.1994.tb00802.x
- 35 Rouault TA. Hepatic iron overload in alcoholic liver disease: why does it occur and what is its role in pathogenesis?. *Alcohol* 2003; **30**: 103-106. doi: 10.1016/s0741-8329(03)00102-2
- 36 Harrison-Findik DD, Schafer D, Klein E, Timchenko NA, Kulaksiz H, Clemens D et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *J Biol Chem* 2006; **281**: 22974-22982. doi: 10.1074/jbc.M602098200

- 37 Milman N, Kirchoff M. Relationship between serum ferritin, alcohol intake, and social status in 2235 Danish men and women. *Ann Hematol* 1996; **72**: 145-151. doi: 10.1007/s002770050153
- 38 Whitfield JB, Zhu G, Heath AC, Powell LW, Martin NG. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcohol Clin Exp Res* 2001; **25**: 1037-1045.
- 39 Ioannou GN, Dominitz JA, Weiss NS, Heagerty PJ, Kowdley KV. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology* 2004; **126**: 1293-1301. doi: 10.1053/j.gastro.2004.01.020
- 40 Fletcher LM, Dixon JL, Purdie DM, Powell LW, Crawford DHG. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology* 2002; **122**: 281-289. doi: 10.1053/gast.2002.30992
- 41 Scotet V, Mérour MC, Mercier AY, Chanu B, Le Faou T, Raguénes O et al. Hereditary hemochromatosis: Effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *Am J Epidemiol* 2003; **158**: 129-134. doi: 10.1093/aje/kwg123
- 42 Lane DJR, Bae DH, Merlot AM, Sahni S, Richardson DR. Duodenal cytochrome *b* (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients* 2015; **7**: 2274-2296. doi: 10.3390/nu7042274
- 43 Chiu PF, Ko SY, Chang CC. Vitamin C affects the expression of hepcidin and erythropoietin receptor in HepG2 cells. *J Ren Nutr* 2012; **22**: 373-376. doi: 10.1053/j.jrn.2011.09.007
- 44 O'Brien RT. Ascorbic acid enhancement of desferrioxamine-induced urinary iron excretion in thalassemia major. *Ann N Y Acad Sci* 1974; **232**: 221-225. doi: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb20588.x
- 45 Modell CB, Beck J. Long-term desferrioxamine therapy in thalassemia. *Ann N Y Acad Sci* 1974; **232**: 201-210. doi: 10.1111/j.1749-6632.1974.tb20586.x
- 46 Brissot P, Deugnier Y, Le Treut A, Regnouard F, Simon M, Bourel M. Ascorbic acid status in idiopathic hemochromatosis. *Digestion* 1978; **17**: 479-487. doi: 10.1159/000198154
- 47 Sarantos K, Evans P, Garbowski M, Davis B, Porter JB. Vitamin C in patients on long-term deferasirox without supplementation. *Blood* 2008; **112**: 1858. doi: 10.1182/blood.V112.11.1858.1858
- 48 Schulz EJ, Swanepoel H. Scorbutic pseudoscleroderma: an aspect of Bantu siderosis. *S Afr Med J* 1962; **36**: 367-372.
- 49 Lynch SR, Seftel HC, Torrance JD, Charlton RW, Bothwell TH. Accelerated oxidative catabolism of ascorbic acid in siderotic Bantu. *Am J Clin Nutr* 1967; **20**: 641-647. doi: 10.1093/ajcn/20.6.641

- 50 Imam MU, Zhang S, Ma J, Wang H, Wang F. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients* 2017; **9**: 3-19. doi:10.3390/nu9070671
- 51 Erlandson ME, Walden B, Stern G, Hilgartner MW, Wehman J, Smith CH. Studies on congenital hemolytic syndromes, IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood* 1962; **19**: 359-378.
- 52 Ringelhan B, Konotey-Ahulu F, Dodu SR. Studies on iron metabolism in sickle cell anaemia, sickle cell haemoglobin C disease, and haemoglobin C disease using a large volume liquid scintillation counter. *J Clin Pathol* 1970; **23**: 127-134. doi:10.1136/jcp.23.2.127
- 53 Omena J, Cople-Rodrigues CS, Cardoso JDA, Soares AR, Fleury MK, Brito FSB et al. Serum hepcidin concentration in individuals with sickle cell anemia: Basis for the dietary recommendation of iron. *Nutrients* 2018; **10**: 498. doi: 10.3390/nu10040498
- 54 Mangaonkar AA, Thawer F, Son J, Ajebo G, Xu H, Barrett NJ et al. Regulation of iron homeostasis through the erythroferrone-hepcidin axis in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2020; **189**: 1204-1209. doi: 10.1111/bjh.16498

Figure and Table Legends

Figure 1. Pathophysiological classification of iron overload (IOL)

Figure 2. Flow diagram of the literature search process

Table 1. Population/participants, criteria, and context (PCC) criteria for the inclusion or exclusion of studies

Table 2. Study Characteristics

Legends for Table 2: Abbreviations: HH, Hereditary Hemochromatosis; SF, Serum Ferritin (Reference Range: 10 – 300 µg/L); DIOS, Dysmetabolic Iron Overload Syndrome; MS, Myelodysplastic Syndrome; IH, Idiopathic Hemochromatosis; DFO, Deferoxamine; DFP, Deferiprone; DFX. Deferasirox; TS, Transferrin Saturation; HIC/LIC, Hepatic Iron Concentration; TIBC, Total Iron-Binding Capacity; NA, not available or non-applicable.

Table S1 – Search strategy conducted on Medline via Ovid.

Search Terms
1. exp iron overload/
2. (iron adj1 overload).ti,ab.
3. hemochromatosis.ti,ab.
4. haemochromatosis.ti,ab.
5. hemosiderosis.ti,ab.
6. haemosiderosis.ti,ab.
7. exp hepcidins/
8. hepcidins.ti,ab.
9. Prohepcidin.ti,ab.
10. Pro-Hepcidin.ti,ab.
11. Liver Expressed Antimicrobial Peptide.ti,ab.
12. Liver-Expressed Antimicrobial Peptide.ti,ab.
13. Antimicrobial Peptide, Liver-Expressed.ti,ab.
14. Peptide, Liver-Expressed Antimicrobial.ti,ab.
15. exp ferritins/
16. ferritin\$.ti,ab.
17. exp transferrin/
18. transferrin.ti,ab.
19. or/1-18
20. exp diet therapy/
21. exp absorption/
22. (diet adj1 therap\$).ti,ab.
23. absorption.ti,ab.
24. (dietary adj1 modification\$).ti,ab.
25. (diet adj1 management).ti,ab.
26. (iron adj3 diet).ti,ab.
27. (nutrients adj3 diet).ti,ab.
28. (nutrition adj3 diet).ti,ab.
29. (micronutrients adj3 diet).ti,ab.
30. (mineral\$ adj3 diet).ti,ab.
31. (iron adj3 nutrition).ti,ab.
32. (Diet adj3 Modification\$).ti,ab.
33. or/20-32
34. 19 and 33
35. exp animals/ not humans.sh.
36. 34 not 35
37. 1 or 2
38. 34 and 37
39. 38 not 35
*40. (Diabetes or pregnancy or Pregnant or NASH or Tumors or Cancer or Neoplasm or HIV or Kwashiorkor or mouse or pig or rat or obesity or obese or Gastrectomy or roux or Parkinson or Alzheimer or Celiac or Giardiasis or Renal or CAPD or Hemodialysis or Athlete).ti,ab.
*41. (Hodgkin or Bariatric Surgery or Inflammatory Bowel or Ulcerative Colitis or Metabolic Syndrome or Chronic Kidney or Helicobacter pylori or Caco 2 cells).ti,ab.
42. 40 or 41
43. 39 not 42

* Diseases or conditions excluded in the search due to the large number of articles found, aiming to improve specificity.

5.2 ARTIGO 2: Iron Absorption in Adults with Sickle Cell Anemia

Iron Absorption in Adults with Sickle Cell Anemia

Juliana Omena¹; Vanessa Monteiro Voll¹; Bernardo Ferreira Braz²; Ricardo Erthal Santelli²; Carmen Marino Donangelo³; Gustavo Federico Jauregui⁴; Cláudia dos Santos Cople-Rodrigues¹; Flávia Fioruci Bezerra¹; Marta Citelli^{1*}

¹Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

²Instituto de Química, Laboratório de Desenvolvimento Analítico, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

³Escuela de Nutrición, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

⁴Departamento de Radiologia, Hospital Universitário Pedro Ernesto, Rio de Janeiro, Brasil.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Financial Support: This study was funded by the Ministry of Health (process # 777022/2012), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (process# 408401/2017-6); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (Finance Code 001).

***Corresponding Author:** Marta Citelli, ¹Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rua São Francisco Xavier Street, 524, 12144F, 20550-900, Maracanã, Rio de Janeiro, Brazil. E-mail: martacitelli@gmail.com

Abstract

Blood transfusions administered to treat the sickle cell anemia (SCA) can lead to iron overload (IOL). Recent studies evaluated the concentration of hepcidin – the hormone mainly responsible for iron homeostasis and intestinal iron absorption – in SCA and observed that the levels of this hormone are higher due to the presence of IOL. Those data suggested that the individuals exposed to IOL may not need to reduce the intake of foods rich in iron. However, these results are not sufficient to establish a nutritional recommendation, since iron absorption capacity in SCA adults is not well understood. The aim of this study was to evaluate the iron absorption capacity in adults with SCA and to compare the possible differences in its absorption, regarding the presence of IOL. Iron absorption capacity was determined by using an iron stable isotope ⁵⁷Fe, measured at 14 days after isotope administration, SCA patients with IOL (SCAio; n=03), SCA without IOL (SCAw; n=10) and control participants without

the disease (CONT; n=12). Markers of iron metabolism and inflammation were evaluated. Serum ferritin was higher in SCAio group than in controls and SCAw participants. Iron absorption and markers of iron metabolism – such as hepcidin – did not differ between all groups studied. It was expected that serum hepcidin levels would be higher in the SCAio group and that, consequently, they would absorb less iron. However, no relationship was found between serum hepcidin and the percentage of iron absorption. Unlike hepcidin, it was observed that ferritin and hepatic iron concentration (LIC) were strongly and negative correlated with the percentage of iron absorption and may possibly influence the iron absorption process. Iron absorption was not detected in one patient in the IOL group. The lack of differences in the iron absorption among the studied groups and the correlation of serum ferritin and iron absorption leads us to believe that SCAio patients may not need to reduce their intake of iron-rich foods, maintaining their absorption capacity similarly to the control participants. Other studies evaluating the intestinal absorption of iron in larger samples of patients with SCAio should be carried out to support the establishment of a safe nutritional approach to be adopted.

Keywords: iron overload; iron absorption; sickle cell anemia; iron stable isotopes; ferritin; hepcidin; liver iron concentration.

5.2.1 Introduction

Sickle cell disease (SCD) is an inherited hemoglobinopathy, caused by a single nucleotide substitution (adenine to thymine) at the sixth codon of the β -globin gene. This change converts a glutamic acid to a valine and leads to the production of hemoglobin S (Hb S), which polymerizes in the presence of hypoxia and is able to damage the sickle erythrocytes, resulting in a series of cellular alterations in red cell morphology, vascular occlusion and chronic hemolysis¹. The term sickle cell disease is used to refer to all the different Hb S genotypes, whereas sickle cell anemia (SCA) refers specifically to homozygosity of the β S gene². Around the world, annually about 275,000 children are born with SCD³ and, in Brazil, there are estimated 30,000 individuals with this hemoglobinopathy in the whole country⁴.

Blood transfusion is administered to treat acute conditions because it minimizes hemolysis and improves the oxygen-carrying capacity by increasing the hemoglobin levels^{5,6} or prevents complications of the disease, as in the prevention of stroke^{6,7,8}. Despite the benefits, regular blood transfusions can lead to iron overload (IOL), since each unit of blood transfused contains nearly 200-250 mg of iron^{9,10}. Chronically transfused patients have an excess of 0.3 to 0.5 mg/kg/day of iron^{11,12} and can store approximately 5 to 10 grams of iron per year¹³. With the progression of IOL, iron becomes potentially toxic, causing oxidative stress and cellular damage from free radical release¹⁴.

Recent studies^{15,16} evaluated the concentration of hepcidin in SCA and observed that the levels of this hormone differed due to the presence of IOL. Hepcidin is a hormone that regulates iron concentration in the plasma and the distribution among different tissues, thereby reducing its bioavailability¹⁷. Participants with transfusional IOL and SCA had higher concentrations of hepcidin compared to other groups and, in contrast, SCA patients without IOL had lower concentrations compared to IOL and control groups¹⁵. Those data suggested that the individuals exposed to IOL may not need to reduce the intake of iron-rich food. However, these results are not sufficient to establish a nutritional recommendation, since some aspects still need to be further investigated. The estimation of iron absorption in the presence or absence of IOL is essential to elucidate this question.

Oral absorption test is one of the most widely used methods to evaluate iron intestinal absorption in humans and can be performed by different methods, such as the enrichment of a meal with stable isotopes, for example. As a large part of the absorbed iron is incorporated into the red blood cells, the biggest advantage of this technique is the ability to estimate the fraction of bioavailable iron¹⁸.

There are four naturally occurring iron stable isotopes at abundances of 5.8% (⁵⁴Fe), 91.8% (⁵⁶Fe), 2.1% (⁵⁷Fe) and 0.3% (⁵⁸Fe)¹⁹. The lowest abundant isotopes – ⁵⁸Fe and ⁵⁷Fe – are commonly used in nutritional research being usually provided as iron metal and converted to ferrous sulfate before administration²⁰.

The aim of this study was to evaluate the iron absorption capacity in adults with sickle cell anemia and to compare the possible differences in its absorption, regarding the presence of iron overload.

5.2.2 Methods

5.2.2.1 Study Participants

Adults patients aged 19 – 50 years old, of both genders, with sickle cell anemia (Hb SS genotype) were recruited from State Institute of Hematology Arthur Siqueira de Cavalcanti (Hemorio, Rio de Janeiro, Brazil). The control group was composed of healthy volunteers without SCA and matched by gender, age and race. Patients with SCA who had been hospitalized 30 days and/or those who received blood transfusions 15 days prior to the first participation in this research were not included in this study. Patients with SCA who had

received blood transfusions during the evaluation test of iron absorption capacity, would be excluded. In the control group, participants with autoimmune diseases, and/or who used medications for treatment of diabetes were excluded. For all groups, women pregnant or experiencing menopause and/or participants who had undergone bariatric surgery and/or who used erythropoietin were not included.

Participants were divided into three groups: sickle cell anemia with IOL (SCAio), composed of patients with serum ferritin > 1000 ng/mL (n = 03); sickle cell anemia without IOL group (SCAw), those with serum ferritin < 1000 ng/mL (n = 10); and control group (C), consisting of individuals without SCA (n = 12). To compare the results without differentiating the presence of IOL, SCAio and SCAw groups were joined (SCA group). Serum ferritin > 1000 ng/mL was adopted base on the cut-off point referenced by Porter and Garbowski²¹.

The Ethical Committee of Clinical Research of State Institute of Hematology Arthur de Siqueira Cavalcanti (419/17) and Pedro Ernesto University Hospital (2.695.418) approved the study protocol. Written informed consent was obtained from each participant.

5.2.2.2 Study Design

Experimental and comparative study whose outcome is the evaluation of iron absorption capacity in adults with SCA (with and without iron overload).

Iron absorption capacity was determined by using an iron stable isotope, a technique where each person acts at his or her own control. The incorporation of ⁵⁷Fe into erythrocytes was measured 14 days after isotope administration^{18,22,23}.

Prior to participating in this study, volunteers were instructed to remain fasting for a period of 10 hours. Blood samples for determination of the isotopic composition of iron, hematological and biochemical analyzes were performed at baseline (day 0) – before the ⁵⁷Fe isotope administration – and on day 14.

After blood collection at baseline, 5 mg of ⁵⁷Fe – in the form of ferrous sulfate – were diluted in 100 mL of unsweetened and free of chemical food preservatives orange juice (Do Bem[®]). The labelled juice was given under close supervision of the investigators. Then, each participant received a 40g packet of salty cassava starch snack without chemical food preservatives (Líder de Minas[®]). No other foods or liquids – except water – were allowed to be ingested for a period of at least 2 hours following this administration.

5.2.2.3 Iron isotope analysis

Elemental ^{57}Fe was purchased from Cambridge Isotope Laboratories (*Cambridge Isotope Laboratories Inc, Massachusetts, EUA*). First, 1 mL of blood collected in a heparin tube was aliquoted in Falcon tubes and centrifuged for 10 minutes at 700xg. Subsequently, the white cells in the sample were removed and 2 mL of nitric acid (65% m/m) bidistilled by sub-boiling were added to preserve the samples. At Analytical Development Laboratory (LaDA) (Institute of Chemistry, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil), 100 mg of packed red blood cells were diluted in 1 mL of ultrapure water. Then, a volume of 500 μL was pipetted into microwave sealed vessels. One milliliter of hydrogen peroxide (30%) and 1 mL of bidistilled nitric acid was added RBC concentrate. The resulting mixture was taken to a microwave oven, at 175 $^{\circ}\text{C}$, for 10 minutes and then cooled at room temperature. After this procedure, the mixture was received ultrapure water up to 5 mL. Finally, the resulting extract iron isotope ratios were determined by an inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (*Thermo Fisher Scientific iCAP[®] Qc, Bremen, Germany*)

5.2.2.4 Calculation ^{57}Fe incorporation into red blood cells and estimation of iron absorption

The quantify of administered ^{57}Fe incorporated into red blood cells ($^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}$) at 14 days after isotope administration was calculated as follows:

$$^{57}\text{Fe}_{\text{inc}} = \frac{R^t - R^0}{R^0} \times \text{circulating Fe (mg)} \times \frac{NA_{^{57}\text{Fe}}}{W_{\text{natural Fe}}} \times m_{^{57}\text{Fe}}$$

R^0 W natural Fe 100

where $^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}$ is expressed in mg, R^t is the $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ ratio at time after dosing (14 days –T14), R^0 is the $^{57}\text{Fe}/^{56}\text{Fe}$ ratio at baseline (T0), circulating Fe is the total circulation iron (mg), W natural Fe is the average atomic weight of Fe (55.845 mg/mmol), $NA_{^{57}\text{Fe}}$ is the natural abundance of ^{57}Fe (2.1191 %), and $m_{^{57}\text{Fe}}$ is the atomic mass of ^{57}Fe (56.935 mg/mmol).

The total circulation Fe (mg) was estimated as follows:

$$\text{Circulating Fe} = \text{Hb} \times \text{BV} \times 3.47 \times 0.001,$$

where Hb is hemoglobin concentration in g/L, BV is blood volume in liters (assumed to be 65 mL/kg body weight for adults) and 3.47 is the concentration of iron in hemoglobin (mg/g). All volumes were expressed in milliliters.

Finally, the calculation of per cent ^{57}Fe absorption is:

$$^{57}\text{Fe}_{\text{absorbed}} (\%) = \frac{^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}}{^{57}\text{Fe}_{\text{dose}}} \times 100 \times 100,$$

where $^{57}\text{Fe}_{\text{inc}}$ is from first equation and the assumed incorporation of the absorbed isotope into red blood cells is 80%.

5.2.2.4 Assessment of Hematological and Biochemical Analysis

Subjects were evaluated at days 0 and 14 and blood samples were collected in ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)-containing, heparin-containing and clot activator gel tubes. Except for the samples collected in EDTA tubes, the others were centrifuged at 700xg for 10 minutes. Serum samples from day zero were aliquoted into microtubes and stored at -80°C until analysis were performed. Complete blood count was performed using an automated counter Sysmex XP-300 (Sysmex[®], Kobe, Japan). Serum iron and total iron-binding capacity (TIBC) were analyzed by a colorimetric method (Bioclin[®], Belo Horizonte, Brazil). Transferrin saturation index (TS) was calculated as follows: serum iron/TIBC x 100. Transferrin values were estimated as follows: TIBC x 0.70. Serum ferritin, bioactive hepcidin-25 and C-reactive protein (PCR) were performed using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Elabscience[®], Wuhan, China). Interleukin 6 (IL-6) (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was also analyzed using ELISA. All analyses were performed according to the manufacturer's instructions.

5.2.2.5 Assessment of liver iron concentration (LIC)

Liver iron concentration (LIC) can predict accurately total body iron stores²⁴. Liver biopsy provides a direct measure of LIC, but is an invasive method with many possible complications. Magnetic Resonance Imaging (MRI) is widely available and offers a noninvasive estimation of LIC¹³.

MRI procedures were carried out in the Radiology Department of Pedro Ernesto University Hospital. To evaluate liver iron overload, upper abdomen MRI was performed on a 1.5 Tesla Optima MR 360 (GE Healthcare, Chicago, USA), using a MRI T2* established method^{25,26}, without administration of contrast or sedation. The LIC was quantified, as

described, in micromols per gram of dry weight ($\mu\text{mol/g}$) of liver with normal values being under $40.0 \mu\text{mol/g}$ ²⁷.

5.2.2.6 Anthropometry and Nutritional Assessment

Body mass and height were determined using portable precision scale (Filizola, São Paulo, Brazil) and wall stadiometer (Seca Brasil, Cotia, Brazil), respectively. Body Mass Index (BMI) was calculated using the formula $(\text{body mass})/(\text{height})^2$. Participants with BMI between 18.5 kg/m^2 and 24.9 kg/m^2 were considered eutrophic according to World Health Organization²⁸.

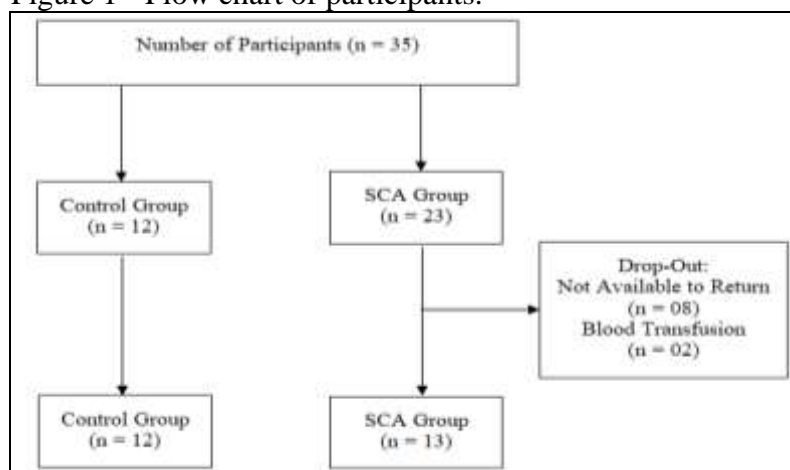
5.2.2.7 Statistical Analysis

Distribution of variables was analyzed for normality using the Shapiro-Wilk test. As most of variables did not present a Gaussian distribution, non-parametric tests were adopted. Measures of central tendency and dispersion were expressed as median and interquartile ranges (1st – 3rd quartile) for continuous variables. In descriptive analysis, for categorical variables, data were expressed as frequencies (n) and percentages (%). Mann-Whitney U test was performed to assess the differences of continuous variables between two groups and Kruskal-Wallis test for the three study groups. Categorical variables were compared using the chi-square test (χ^2) or Fisher's exact test. Spearman's correlation coefficient was used to measure association between continuous variables. P values < 0.05 were considered significant. The statistical analysis was performed using the Statistical Package for Social Science software (IBM SPSS[®] Inc., version 22.0, Chicago, USA) and graphics were performed using GraphPad Prism software (GraphPad Inc, version 5.0, La Jolla, USA).

5.2.3 Results

A total of 35 individuals participated in this study; 25 met the inclusion criteria (Figure 1).

Figure 1 - Flow chart of participants.



Thirteen had SCA (53.8 %, female), and 12 were included as a control group (58.3 %, female). The median age of patients with SCA was 31.0 years (Interquartile Range, IQR: 27.5 – 37.5 years), while the control group was 29.5 (IQR: 26.5 – 40.0 years), denoting homogeneity among individuals ($p = 0.852$). Most of the participants self-referred itself as black or brown and were classified as eutrophic in both groups (Table 1).

Among participants with SCA, 06 (46.2 %) are using hydroxyurea and only 01 reported the previous use of iron chelator (7.7%).

Table 1 – Frequency of general characteristics of control group and SCA patients.

Continuous Variable	Control			SCA			<i>p</i> value (*)
	n	Median	IQR	n	Median	IQR	
Age (years)	12	29.5	26.5 – 40.0	13	31.0	27.5 – 37.5	0.852
Categorical Variables	n	%		n	%		
<u>Gender</u>							
Male	05	41.7		06	46.2		0.570
Female	07	58.3		07	53.8		
<u>Race/Ethnicity</u>							
White	01	8.4		0	0		
Black	04	33.3		07	53.8		0.428
Brown	07	58.3		06	46.2		
Other	0	0		0	0		
<u>BMI</u>							
Underweight	0	0		04	30.8		
Eutrophic	06	50.0		09	69.2		0.008*
Overweight	03	25.0		0	0		
Obese	03	25.0		0	0		

Results are expressed as median and interquartile ranges (IQR): P25 – P75: 25th – 75th percentile for continuous variables and as frequencies (n) and percentages (%) for categorical variables. Differences between two groups were performed using Mann-Whitney U Test (for continuous variable) and chi-squared test or Fisher's exact test (for categorical variables). Asterisk indicates statistical difference ($p < 0.05$) between groups. Abbreviations: SCA: Sickle Cell Anemia; N: Number of participants; BMI: Body Mass Index.

Hematological and biochemical data were obtained from a single group of participants with SCA, without separation of SCAw and SCAio groups, and are presented in Table 2. As expected, individuals with SCA presented lower red blood cells and hemoglobin concentrations and hematocrit, and higher red cell distribution width (RDW) and leukocytes when compared with the control group ($p < 0.0001$). Serum ferritin was higher in SCA group than in control participants; this result was also expected, since some patients with SCA have IOL. Regarding other markers of iron metabolism and inflammation, there was no significant differences between groups. Also, iron absorption did not differ between SCA patients and control group ($p = 0.837$).

Table 2 – Comparison of laboratorial parameters between the control group and SCA patients.

Parameters	Control (n = 12)		SCA (n = 13)		p value (*)
	Median	IQR	Median	IQR	
RBC (x 10 ⁶ μ /L)	4.7	4.3 – 5.2	2.9	2.3 – 3.2	< 0.0001 *
Hemoglobin (g/dl)	12.5	11.8 – 13.5	7.9	6.6 – 9.3	< 0.0001 *
Hematocrit (%)	39.0	36.4 – 42.3	23.7	21.1 – 27.5	< 0.0001 *
RDW (%)	13.4	12.8 – 14.8	19.4	17.5 – 20.6	< 0.0001 *
Leukocytes (x 10 ³ μ /L)	5.7	4.2 – 7.6	10.2	8.6 – 12.3	< 0.0001 *
Ferritin (ng/mL)	93.3	52.1 – 121.1	128.8	103.7 – 855.0	0.01 *
Hepcidin (ng/mL)	6.2	1.7 – 8.2	7.8	4.1 – 22.9	0.110
Serum iron (μ g/dL)	105.9	54.9 – 169.6	133.3	75.4 – 153.6	0.606
TIBC (μ g/dL)	301.9	236.6 – 472.8	354.5	199.2 – 456.6	0.824
Transferrin (mg/dL)	211.3	165.6 – 330.9	248.1	139.4 – 319.6	0.824
TS (%)	23.2	21.6 – 59.5	37.6	29.3 – 68.9	0.370
Iron Absorption (%) ¹	15.4	1.7 – 40.7	9.9	3.0 – 39.0	0.837
IL-6 (pg/mL)	0.1	0.04 – 1.2	3.7	0.2 – 8.8	0.066
CRP (ng/mL)	0.4	0.2 – 1.5	1.1	0.5 – 1.5	0.225

Results are expressed as median and interquartile ranges (IQR); P25 – P75: 25th – 75th percentile. Differences between groups was performed using Mann-Whitney U Test. Asterisk indicates statistical difference ($p < 0.05$) between groups. Abbreviations: SCA: Sickle Cell Anemia; RBC: Red Blood Cells; RDW: Red Cell Distribution Width; TIBC: Total Iron Binding Capacity; TS: Transferrin Saturation; IL-6: Interleukin-6.; CRP: C-Reactive Protein; ND: Not detected. ¹Iron Absorption (05 ND values in control group and 04 in SCA group).

Considering serum ferritin levels, patients with SCA were then divided into SCAw group (individuals with SCA and ferritin < 1000 ng/mL; n = 10) and SCAio group (individuals with SCA and ferritin > 1000 ng/mL; n = 03) (Table 3). Red blood cells and hematocrit were lower in SCAw and SCAio than in the control group ($p < 0.001$), in agreement with previous data on Table 2. No statistical differences were observed in these parameters between the two SCA groups. Leukocytes presented higher median in SCAio group ($12.7 \times 10^3 \mu$ /L) than in SCAw ($9.7 \times 10^3 \mu$ /L) and control ($5.7 \times 10^3 \mu$ /L) groups. Furthermore, serum ferritin concentration was higher in SCAio group than in the SCAw, but it did not differ between SCAw and control groups. In the SCA group, ferritin was strongly

correlated with TIBC ($r_s = 0.893$; $p = 0.007$), serum iron ($r_s = 0.850$; $p = 0.007$) and transferrin ($r_s = 0.893$; $p = 0.007$), while in the control group ferritin correlated moderately with TIBC and transferrin ($r_s = -0.673$; $p = 0.023$ for both).

Hepcidin and other markers of iron metabolism did not present statistical difference among the groups. No significant correlations were observed between hepcidin and ferritin, CRP, IL-6 and LIC.

Like these iron markers, the iron absorption did not differ among the groups; however, we observed that median values of iron absorption in SCAio group (median: 3.0%) were lower compared to SCAw (median: 10.8 %) and controls (15.4%). Probably these results were affected by the small sample size of the SCAio group, which had only three participants (only two presented detected values), which may have reduced the statistical power of these analyzes.

Regarding inflammation markers, CRP levels were twice higher in SCAio group than in SCAw ($p = 0.038$). There was no significant difference in IL-6 among the three groups.

Table 3 – Comparison of laboratorial parameters between control group, SCAw and SCAio patients.

Parameters	Control (n = 12)		SCAw (n = 10)		SCAio (n = 03)		p value (*)
	Median	Range	Median	Range	Median	Range	
RBC ($\times 10^6 \mu/L$)	4.7 ^x	4.0 – 5.9	2.9 ^y	1.7 – 4.3	2.4 ^y	2.3 – 3.6	< 0.0001 *
Hemoglobin (g/dl)	12.5 ^x	10.7 – 15.0	8.1 ^y	6.2 – 9.7	7.6 ^{xy}	6.3 – 12.2	< 0.0001 *
Hematocrit (%)	39.0 ^x	34.4 – 48.0	23.7 ^y	17.9 – 30.9	22.9 ^y	20.9 – 35.8	< 0.0001 *
RDW (%)	13.4 ^x	12.3 – 16.4	19.8 ^y	14.5 – 24.7	17.5 ^y	17.5 – 19.9	< 0.0001 *
Leukocytes ($\times 10^3 \mu/L$)	5.7 ^x	3.5 – 10.2	9.7 ^y	7.8 – 16.9	12.7 ^z	10.7 – 17.1	< 0.0001 *
Ferritin (ng/mL)	93.3 ^x	9.0 – 393.0	122.8 ^x	75.7 – 467.0	1339.0 ^y	1242.9 – 2908.7	0.005 *
Hepcidin (ng/mL)	6.2	0.6 – 9.3	14.1	3.0 – 31.9	6.2	3.3 – 7.8	0.135
Serum iron ($\mu g/dL$)	105.9	14.5 – 217.4	133.3	64.7 – 407.8	150.7	23.5 – 153.6	0.754
TIBC ($\mu g/dL$)	301.9	62.6 – 494.6	400.4	180.1 – 571.3	199.2	192.2 – 206.2	0.216
Transferrin (mg/dL)	211.3	43.8 – 346.2	280.3	126.1 – 399.9	139.4	134.5 – 144.4	0.216
TS (%)	23.2	14.4 – 91.9	37.6	26.8 – 71.4	45.7	11.4 – 80.0	0.559
Iron Absorption (%) ¹	15.4	1.6 – 78.2	10.8	1.1 – 64.2	3.0	0.5 – 5.4	0.351
IL-6 (pg/mL)	0.1	0.03 – 2.0	2.5	0.03 – 24.5	4.0	0.3 – 10.8	0.156
CRP (ng/mL)	0.1 ^{xy}	0.1 – 2.1	0.9 ^x	0.2 – 1.6	1.8 ^y	1.1 – 1.9	0.150 ^e

Results are expressed as median and ranges (minimum – maximum). Differences among three groups were tested using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Post hoc analysis was performed using the Mann-Whitney U Test for two groups ($p < 0.05$). Different letters indicate statistical difference between groups. ^eCRP (SCAw vs. SCAio $p = 0.049$). Abbreviations: SCAw: Sick Cell Anemia without iron overload; SCAio: Sick Cell Anemia with iron overload; TIBC: Total Iron Binding Capacity; TS: Transferrin Saturation; IL-6: Interleukin-6; CRP: C-Reactive Protein. ND: Not detected; ¹Iron Absorption (05 ND values in control group, 03 in SCAw and 01 in SCAio group).

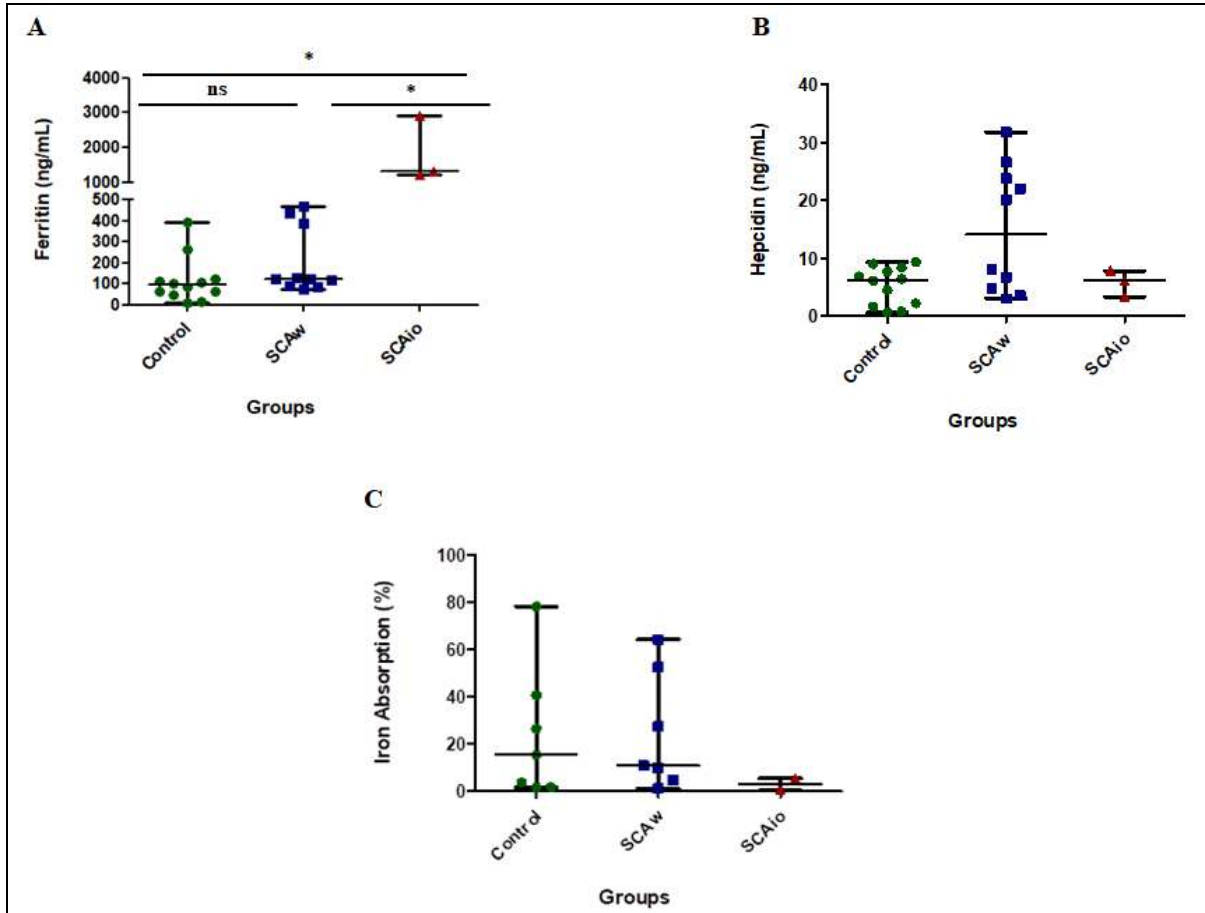
Table 4 – Iron absorption, liver iron concentration (LIC), serum ferritin and hepcidin concentrations of control group, SCAw and SCAio patients.

Participants	Group	Iron Absorption (%)	LIC ($\mu\text{mol/g}$)	Ferritin (ng/mL)	Hepcidin (ng/mL)
01	Control	ND	NM	86.1	6.4
02		3.7	NM	62.0	6.8
03		ND	NM	64.0	0.8
04		26.5	NM	48.7	0.6
05		1.7	NM	100.4	6.1
06		ND	NM	124.2	2.2
07		ND	NM	14.9	9.0
08		15.4	NM	108.5	1.6
09		78.2	NM	9.0	8.4
10		40.7	NM	392.5	4.5
11		1.6	NM	112.0	7.7
12		ND	NM	262.3	9.3
13	SCAw	ND	NM	386.5	3.0
14		ND	NM	436.4	22.0
15		52.5	20.0	119.1	3.5
16		64.2	18.0	82.5	20.1
17		4.9	24.0	121.1	31.8
18		ND	NM	124.7	23.8
19		9.9	28.0	467.0	26.6
20		10.8	19.0	75.7	8.1
21	27.3	NM	88.3	4.7	
22	1.1	NM	128.8	6.7	
23	SCAio	0.5	54.0	1339.0	6.2
24		5.4	76.0	1242.9	3.3
25*		ND	NM	2908.7	7.8

Abbreviations: SCAw: Sickle Cell Anemia without iron overload; SCAio: Sickle Cell Anemia with iron overload; LIC: Liver iron concentration. ND: Not detected; NM: Not measured. *Participant 25: iron absorption measured only on days 0 (T0) and 7 (T7). LIC cut-off point for normal values: < 40 $\mu\text{mol/g}$.

Table 4 shows the iron absorption, LIC, ferritin and hepcidin values for all participants. Of the 25 participants, only seven performed the magnetic resonance imaging to assess the liver iron concentration (LIC) – five SCAw and two SCAio individuals. The two participants with IOL had LIC values above the reference range, with the diagnosis of hepatic IOL (mild grade). The other participants presented LIC values below de cut-off point. Ferritin, hepcidin and iron absorption values for each group are presented in Figure 2.

Figure 2 - Ferritin, hepcidin and iron absorption values of control group, SCAw and SCAio patients.



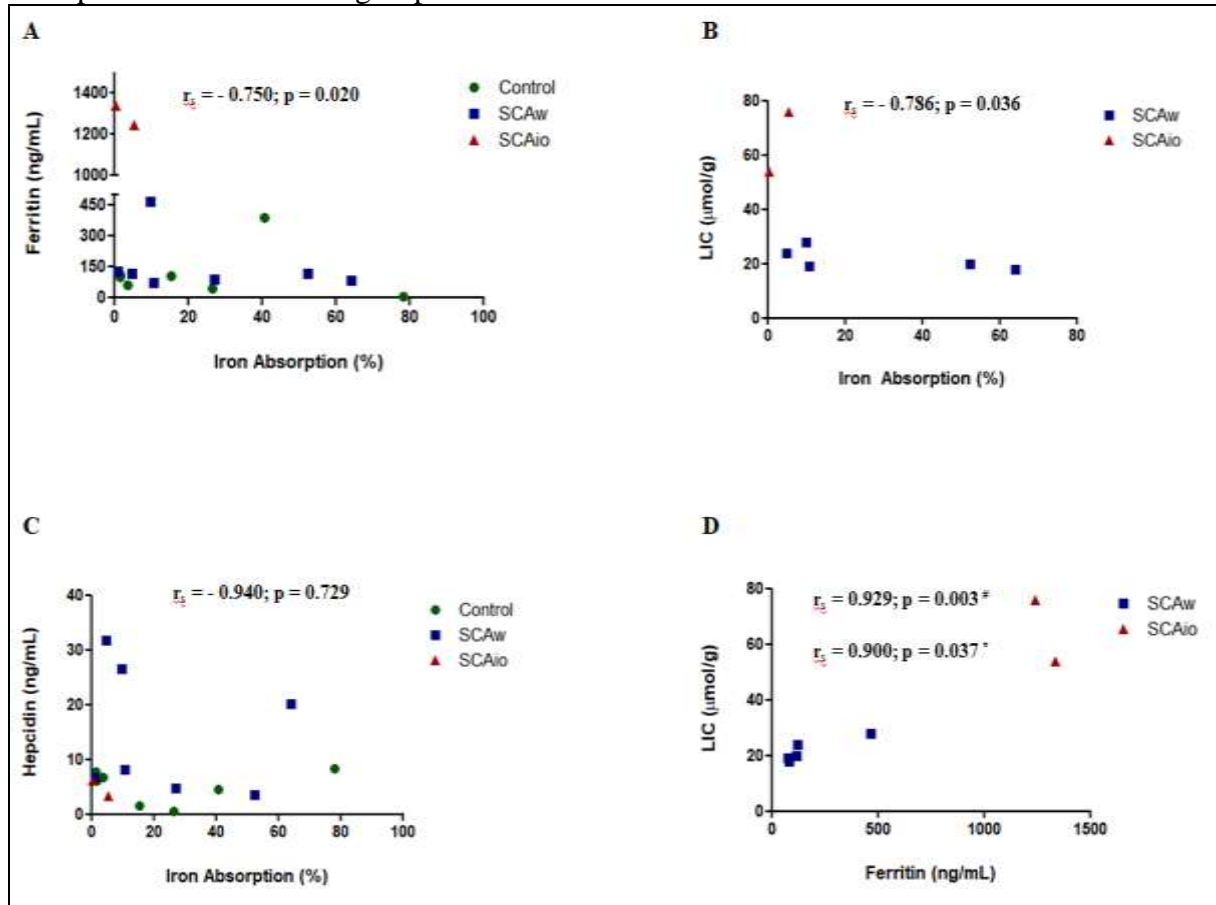
Ferritin (**2A**), hepcidin (**2B**) and iron Absorption (**3C**) values are compared between all groups. Results are expressed as median and ranges (minimum – maximum). Differences among three groups were tested using Kruskal-Wallis test ($p < 0.05$). Post hoc analysis was performed using the Mann-Whitney U Test for two groups ($p < 0.05$). Asterisk indicates statistical difference between groups. Abbreviations: ns: not significant. SCAw: Sickle Cell Anemia without iron overload; SCAio: Sickle Cell Anemia with iron overload.

Strong positive correlations were observed between LIC and serum ferritin concentrations in SCA group (SCAw + SCAio participants together) ($r_s = 0.929$; $p = 0.003$) and in SCAw patients ($r_s = 0.900$; $p = 0.037$). No significant correlations were observed between serum hepcidin and LIC.

It was observed that the lowest absorption rate was 0.5 % in a participant of SCAio group, whose serum ferritin was 1339.0 ng/mL, while the highest iron absorption was found in the control group (78.2% of iron absorption and serum ferritin 9.0 ng/mL).

Strong and negative correlations were found between iron absorption and serum ferritin ($r_s = -0.750$; $p = 0.020$) and between iron absorption and LIC values ($r_s = -0.786$; $p = 0.036$) in SCA group. No significant correlations were observed between serum hepcidin and iron absorption. Spearman correlations between serum ferritin, LIC, hepcidin and iron absorption are presented in Figure 3.

Figure 3 - Spearman's correlations analysis between ferritin, LIC, hepcidin and iron absorption values between groups.



Correlations of iron absorption with ferritin (**3A**), LIC (**3B**), hepcidin (**3C**) and LIC with ferritin (**4D**). All correlations were performed using Spearman's correlation coefficient (significant when $p < 0.05$). In figures **3A** and **3B**, r_s and p values refer to SCA group (SCAw + SCAIo). Figure **3D**: $^{\#} r_s$ and p values refer to SCAw group (SCAw + SCAIo); $^* r_s$ and p values refer to SCAw group. Abbreviations: SCAw: Sickle Cell Anemia without iron overload; SCAIo: Sickle Cell Anemia with iron overload; r_s : Spearman's correlation coefficient.

5.2.4 Discussion

In the present study, there was no significant differences in the iron absorption capacity between individuals with SCA, although participants with IOL had low absorption rates. To our knowledge, this is the first study to evaluate the iron absorption in adults with SCA and the first to consider the presence or absence of IOL.

However, two previous studies estimated the iron absorption in patients with SCD (mixed genotypes were included) with administration of radioactive isotopes. Erlandson et al.²⁹ provided ^{59}Fe in the form of ferrous sulfate to five children and adolescents with SCD and evaluated the iron absorption by recovering the amount of isotope excreted in feces (fecal recovery method) for five days. After this time, sickle cell patients absorbed between 12 – 51% of the radioisotope and the highest values were found in participants with SS genotype (31 – 51 % of iron absorption). Healthy controls absorbed between 5 – 27 %. However, it is

important to note that the transfusional behavior of SCA participants was diverse and, although they did not perform regular transfusions, it is not possible to know whether the participants had IOL. No information of serum ferritin or hepatic iron content was provided in this study. It is important to note that this population had children and adolescents, a group with a greater daily iron requirement than adults due growth and development. Therefore, the iron absorption observed in these patients may be different from the iron absorption presented in adults.

In 1970, Ringelhan and colleagues³⁰ also performed an iron absorption test by the administration of 5 mg ⁵⁹Fe (ferrous sulfate) to 17 men (SS and SC genotypes), using the fecal recovery method and the incorporation of iron in erythrocytes, measured at seventh and eighth days. Although the highest absorption values were observed in participants with SCA (74 %), there was a large dispersion around the mean values of all groups studied and the results did not differ statistically. The authors do not mention the transfusional behavior of participants or the presence of IOL.

In our study, we observed that parameters such as serum ferritin and hepatic iron concentration were strongly and negatively correlated with iron absorption. Although regression analyzes have not been performed, it is plausible that these variables may have contributed to the decrease of iron absorption. Similar results between serum ferritin and iron absorption were found in earlier studies with normal subjects³¹ and with idiopathic hemochromatosis patients³².

Similar to the previous study carried out by our group in 2018¹⁵, we believed that serum hepcidin levels would be higher in the SCAio group and that, consequently, these individuals would absorb less amount of dietary iron. However, hepcidin levels did not differ between controls and SCA group and, when separated accordingly to the absence or presence of IOL (SCAw and SCAio groups, respectively), the values remained without differences among all groups. Unlike ferritin, no relationship was found between serum hepcidin and the percentage of iron absorption in the groups studied. Especially in SCAio group, the small sample size enabled correlation analyzes. As far as we know, the correlation of hepcidin and iron absorption capacity has not been investigated in SCA.

Previous studies determined whether serum ferritin and hepcidin predicts dietary iron absorption in healthy and iron-deficient individuals^{33,34}. Using a multiple linear regression model, Zimmermann and cols. (2009)³⁴ observed that hepcidin is only a modest predictor of dietary iron bioavailability in humans. In a regression with iron metabolism parameters, the model that best predicted iron absorption contained age, hemoglobin and serum ferritin and explained 43% of the variance in iron absorption; when ferritin was excluded from the model,

hepcidin and age were predictors, but explained only 28% of the variance of iron absorption. Thus, serum ferritin seemed to be a better predictor of iron absorption compared to hepcidin.

Other iron metabolism parameters have not shown significant differences among groups, but some values are abnormally high in controls. As three participants from the control group reported the use of multivitamins-mineral supplements, this may have influenced parameters like serum iron, TIBC, transferrin and transferrin saturation and it can explain some outliers values.

A limitation of our study is the small sample size, especially in SCAio group. However, the lack of larger samples is a limitation shared by other studies with sickle cell disease^{35,36} and iron absorption^{37,38}.

The iron isotope incorporations in red blood cells were not detected in ten participants of the present study. Although the lack of detection of isotope has already been reported²⁸, we believed that the iron absorption in those individuals may have been extremely low, exceeding the sensitivity of the ICP-MS equipment in quantifying these differences. Although it might have contributed to the lack of difference in the values of iron absorption among the groups, it is also necessary to emphasize the importance of considering the heterogeneity of iron metabolism parameters of individuals with SCA, especially in the presence of IOL. Therefore, the higher levels of serum ferritin and hepatic iron concentration in the SCAio group may possibly have induced a reduction in iron absorption of these individuals.

5.2.5 Conclusion

The lack of differences in the iron absorption among the studied groups and the correlation of serum ferritin and iron absorption led us to believe that SCAio patients may not need to reduce their intake of iron-rich food, maintaining their absorption similar to the individuals without the disease. Further studies evaluating the intestinal iron absorption using larger sample sizes of SCAio patients should be conducted to assist in the establishment of a safe nutrition approach to be adopted and to guarantee the security of these public policies to this group.

5.2.6 References

- 1 Conran N, Franco-Penteado CF, Costa FF. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 2009; **33**: 1-16. doi: 10.1080/03630260802625709

- 2 Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sick cell disease. *Lancet* 2010; **376**: 2018-2031. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X
- 3 Modell B, and Darlison M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ* 2008; **86**: 480-487. doi: 10.2471/blt.06.036673
- 4 Kato GJ, Piel FB, Reid CD, Gaston MH, Ohene-Frempong K, Krishnamurti L et al. Sick cell disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018; **4**: 1-22.
- 5 Harmatz P, Butensky E, Quirolo K, Williams R, Ferrell L, Moyer T et al. Severity of iron overload in patients with sick cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood* 2000; **96**: 76-79. doi: 10.1182/blood.V96.1.76
- 6 Josephson CD, Su LL, Hillyer KL, Hillyer CD. Transfusion in the patient with sick cell disease: a critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfus Med Rev* 2007; **21**: 118-133. doi: 10.1016/j.tmr.2006.11.003
- 7 Adams RJ, McKie VC, Hsu L, Files B, Vichinsky E, Pegelow C et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sick cell anemia and abnormal results on transcranial Doppler ultrasonography. *N Engl J Med* 1998; **339**: 5-11. doi: 10.1056/NEJM199807023390102
- 8 Adams RJ, Brambilla D, and Optimizing Primary Stroke Prevention in Sick Cell Anemia (STOP 2) Trial Investigators. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sick cell disease. *N Engl J Med* 2005; **353**: 2769-2778. doi: 10.1056/NEJMoa050460
- 9 Inati A, Khoriaty E, Mussalam KM. Iron sick cell disease: what have we learned over the years?. *Pediatr Blood Cancer* 2011; **56**: 182-190. doi: 10.1002/pbc.22721
- 10 Thuret, I. Post-transfusional iron overload in the haemoglobinopathies. *C R Biol* 2013; **336**: 164-172. doi: 10.1016/j.crv.2012.09.010
- 11 Cohen A, Masera G, Zoumbos N, Uysal Z, Boulet D, Watman N et al. Effect of iron intake on control of body iron in patients with thalassemia major treated with Deferasirox (Exjade®, ICL670). *Blood* 2005; **106**: 822. doi: 10.1182/blood.V106.11.822.822
- 12 Flanagan JM, Steward S, Howard T, Hankins J, Ware RE. The relationship between hepcidin and iron overload in sick cell anemia. *Pediatr Blood Cancer* 2009; **48**: 615.
- 13 Hoffbrand AV, Taher A, Cappellini MD. How I treat transfusional iron overload. *Blood* 2012; **120**: 3657-3669. doi: 10.1182/blood-2012-05-370098
- 14 Ward R. An update on disordered iron metabolism and iron overload. *Hematology* 2010; **15**: 311-317. doi: 10.1179/102453310X12647083621164
- 15 Omena J, Cople-Rodrigues CS, Cardoso JDA, Soares AR, Fleury MK, Brito FSB et al. Serum hepcidin concentration in individuals with sick cell anemia: Basis for the dietary recommendation of iron. *Nutrients* 2018; **10**: 498. doi: 10.3390/nu10040498

- 16 Mangaonkar AA, Thawer F, Son J, Ajebo G, Xu H, Barrett NJ et al. Regulation of iron homeostasis through the erythroferrone-hepcidin axis in sickle cell disease. *Br J Haematol* 2020; **189**: 1204-1209. doi: 10.1111/bjh.16498
- 17 Ganz T, Nemeth E. Heparidin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012; **1823**: 1434-1443. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.01.014
- 18 International Atomic Energy Agency (IAEA). *Assessment of iron bioavailability in humans using stable iron isotope techniques*. IAEA Human Health Series no 21 (International Atomic Energy Agency, Austria, 2012).
- 19 Walczyk T and von Blanckenburg F. Deciphering the iron isotope message of the human body. *Int J Mass Spectrom* 2005; **242**: 117-134. doi: 10.1016/j.ijms.2004.12.028
- 20 Abrams AS. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. *Am J Clin Nutr* 1999; **70**: 955-964. doi: 10.1093/ajcn/70.6.955
- 21 Porter J, Garbowski M. Consequences and management of iron overload in sickle cell disease. *Hematology* 2013; **2013**: 447-456. doi: 10.1182/asheducation-2013.1.447
- 22 Kastenmayer P, Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, Hercberg S, and Hurrell RF. A double stable isotope technique for measuring iron absorption in infants. *Br J Nutr* 1994; **71**: 411-424. doi: 10.1079/bjn19940148
- 23 Chen Z, Griffin IJ, Plumlee LM, Abrams SA. High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry allows rapid assessment of iron absorption in infants and children. *J Nutr* 2005; **135**: 1790-1795. doi: 10.1093/jn/135.7.1790
- 24 Angelucci E, Brittenham GM, McLaren CE, Ripalti M, Baronciani D, Giardini C et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *N Engl J Med* 2000; **343**: 327-331. doi: 10.1056/NEJM200008033430503
- 25 St Pierre TG, Clark PR, Chua-anusorn W, Fleming AJ, Jeffrey GP, Olynyk JK et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood* 2005; **105**: 855-861. doi: 10.1182/blood-2004-01-0177
- 26 Hankins JS, McCarville MB, Loeffler RB, Smeltzer MP, Onciu M, Hoffer FA et al. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood* 2009; **113**: 4853-4855. doi: 10.1182/blood-2008-12-191643
- 27 Labranche R, Gilbert G, Cerny M, Vu KN, Soulières D, Olivie D et al. Liver iron quantification with MR imaging: a primer for radiologists. *Radiographics* 2018; **38**: 392-412. doi: 10.1148/rg.2018170079
- 28 World Health Organization (WHO). *WHO expert committee on Physical status: The use and interpretation of anthropometry*. Geneva: [s.n.], 1995.
- 29 Erlandson ME, Walden B, Stern G, Hilgartner MW, Wehman J, and Smith CH. Studies on congenital hemolytic syndromes. IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood* 1962; **19**: 359-378.

- 30 Ringelhann B, Konotey-Ahulu F, and Dodu SRA. Studies on iron metabolism in sickle cell anaemia, sickle cell haemoglobin C disease, and haemoglobin C disease using a large volume liquid scintillation counter. *J Clin Pathol* 1970; **23**: 127-134. doi: 10.1136/jcp.23.2.127
- 31 Cook JD, Lipschitz DA, Miles LEM, and Finch CA. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *Am J Clin Nutr* 1974; **27**: 681-687. doi: 10.1093/ajcn/27.7.681
- 32 Lynch SR, Skikne BS, and Cook JD. Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood* 1989; **74**: 2187-2193.
- 33 Roe MA, Collings R, Dainty JR, Swinkels DW, and Fairweather-Tait SJ. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. *Am J Clin Nutr* 2009; **89**:1088-1091. doi: 10.3945/ajcn.2008.27297
- 34 Zimmermann MB, Troesch B, Biebinger R, Egli I, Zeder C, and Hurrell RF. Plasma hepcidin is a modest predictor of dietary iron bioavailability in humans, whereas oral iron loading, measured by stable-isotope appearance curves, increases plasma hepcidin. *Am J Clin Nutr* 2009; **90**: 1280-1287. doi: 10.3945/ajcn.2009.28129
- 35 Nemeth E, Valore EV, Territo M, Schiller G, Lichtenstein A, and Ganz T. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood* 2003; **101**: 2461-2463. doi: 10.1182/blood-2002-10-3235
- 36 Kearney SL, Nemeth E, Neufeld EJ, Thapa D, Ganz T, Weinstein DA et al. Urinary hepcidin in congenital chronic anemias. *Pediatr Blood Cancer* 2007; **48**: 57-63. doi: 10.1002/pbc.20616
- 37 Kastenmayer P, Davidsson L, Galan P, Cherouvrier F, Hercberg S, and Hurrell RF. *Br J Nutr* 1994; **71**: 411-424. doi: 10.1079/bjn19940148
- 38 von Blanckenburg F, Oelze M, Schmid DG, van Zuilen K, Gschwind HP, Slade AJ et al. An iron stable isotope comparison between human erythrocytes and plasma. *Metallomics* 2014; **6**: 2052-2061. doi: 10.1039/c4mt00124a

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os resultados desta tese levam ao entendimento claro de que há necessidade de restrição da ingestão de ferro dietético na sobrecarga de ferro primária. Observou-se que o consumo de antioxidantes pode ser considerado como uma terapia auxiliar à sobrecarga de ferro, visto que o consumo de chá preto apresentou-se mais eficiente do que o uso de componentes separados, e que o consumo de álcool e suplementos com vitamina C devem ser evitados por reagirem com o ferro, formando produtos tóxicos.

Por outro lado, pessoas com doença falciforme e sobrecarga de ferro secundária parecem não necessitar desta restrição dietética devido a mecanismos autorregulatórios de controle de absorção de ferro. Observou-se uma forte correlação negativa da ferritina sérica e da concentração de ferro hepático com o percentual de absorção. Estes resultados nos levam a acreditar que pessoas com AF e sobrecarga de ferro possivelmente não necessitam restringir a ingestão de alimentos fonte de ferro. Além disso, os resultados parecem indicar que as concentrações séricas de hepcidina não estão diretamente relacionados à absorção de ferro intestinal.

A proposta de avaliar a capacidade de absorção de ferro surgiu a partir da necessidade de compreensão do metabolismo de ferro na DF e de entendimento para tornar mais segura a ingestão dietética de ferro. Dados na literatura a respeito da absorção de ferro em pessoas com a referida hemoglobinopatia ainda são escassos e não englobam os diferentes aspectos que podem estar presentes e influenciar a absorção, dentre eles a sobrecarga de ferro.

O ineditismo do presente trabalho está na sistematização de estudos que trazem compreensão sobre os efeitos na sobrecarga de ferro ocasionados pela ingestão de nutrientes e outras substâncias; e na avaliação da capacidade de absorção intestinal de ferro, considerando a presença e ausência de sobrecarga de ferro na anemia falciforme.

Estes resultados contribuem para a literatura a respeito do tema e abrem caminho para futuros estudos que avaliem a absorção de ferro na DF, contribuindo para o início da construção e estabelecimento de uma abordagem nutricional segura a ser adotada, que deverá garantir também que as políticas públicas já implementadas no país não coloquem em risco a saúde destas pessoas.

REFERÊNCIAS

- ABRAMS, S. A. et al. Absorption by 1-year-old children of an iron supplement given with cow's milk or juice. *Pediatric Research*, v. 39, n. 1, p. 171-175, 1996.
- ABRAMS, S. A. Using stable isotopes to assess mineral absorption and utilization by children. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 70, n. 6, p. 955-964, 1999.
- ADAMS, R. J. et al. Prevention of a first stroke by transfusions in children with sickle cell anemia and abnormal results on transcranial doppler ultrasonography. *The New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 1, p. 5-11, 1998.
- ADAMS, R. J.; BRAMBILLA, D. Discontinuing prophylactic transfusions used to prevent stroke in sickle cell disease. *The New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 26, p. 2769-2778, 2005.
- ADAMS, P.; BRISSOT, P.; POWELL, L. W. EASL International Consensus Conference on Haemochromatosis. *Journal of Hepatology*, v. 33, n. 3, p. 485-504, 2000.
- ALAYASH, A. I. Oxidative pathways in the sickle cell and beyond. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 70, p.78-86, 2017.
- ALQASOUMI, S. et al. Effect of 6-shogaol and 6-gingerol on diclofenac sodium induced liver injury. *International Journal of Pharmacology*, v. 7, n. 8, p. 868-873, 2011.
- AMMANN, A. Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP MS): a versatile tool. *Journal of Mass Spectrometry*, v. 42, n. 4, p. 419-427, 2007.
- ANDERSON, G. J.; FRAZER, D. M.; MCLAREN, G. D. Iron absorption and metabolism. *Current Opinion in Gastroenterology*, v. 25, n. 2, p. 129-135, 2009.
- ANGELUCCI, E. et al. Hepatic iron concentration and total body iron stores in thalassemia major. *New England Journal of Medicine*, v. 343, n. 5, p. 327-331, 2000.
- ANGELUCCI, E. et al. Italian Society of Hematology practice guidelines for the management of iron overload in thalassemia major and related disorders. *Haematologica*, v. 93, n. 5, p. 741-752, 2008.
- AULT, P.; JONES, K. Understanding iron overload: Screening, monitoring, and caring for patients with transfusion-dependent anemias. *Clinical Journal of Oncology Nursing*, v. 13, n. 5, p. 511-517, 2009.
- BACK, D. Z. et al. Of macrophages and red blood cells: a complex love story. *Frontiers in Physiology*, v. 5, n. 9, p. 1-11, 2014.
- BACON, B. R. et al. Diagnosis and management of hemochromatosis: 2011 practice guideline by the American Association for the Study of Liver Diseases. *Hepatology*, v. 54, n. 1, p. 328-343, 2011.

- BAKER, R. D. et al. Diagnosis and prevention of iron deficiency iron-deficiency anemia in infants and young children (0-3 years of age). *Pediatrics*, v. 126, n. 5, p. 1040-1050, 2010.
- BALLAS, S. K. Iron Overload is a determinant of morbidity and mortality in adult patients with sickle cell disease. *Seminars in Hematology*, Filadélfia, v. 38, n. 1, Suppl. 1, p. 30-36, 2001.
- BALLAS, S. K. Sickle Cell anaemia: Progress in pathogenesis and treatment. *Drugs*, v. 62, n. 8, p. 1143-1172, 2002.
- BALLAS, S. K. et al. Definitions of phenotypic manifestations of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 85, n. 1, p. 6-13, 2010.
- BALLAS, S. K.; GUPTA, K.; ADAMS-GRAVES, P. Sickle cell pain: a critical reappraisal. *Blood*, v. 120, n. 18, p. 3647-3656, 2012.
- BARBOUR, R. *Determinação de impurezas em cobre eletrolítico por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado*. 2011. 102 f. Tese (Doutorado em Química Analítica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, 2011.
- BARDEN, E. M. et al. Total and resting energy expenditure in children with sickle cell disease. *The Journal of Pediatrics*, . 136, n. 1, p. 73-79, 2000.
- BARSAGLINI, R. A.; PAZ, K. M.; LEMOS, P. L. Qualidade de vida e cuidado às pessoas com doença falciforme. *Interface – Comunicação, Saúde, Educação*, v. 19, n. 52, p. 195-199, 2015.
- BEISEIGEL, J. M. et al. Iron bioavailability from maize and beans: a comparison of human measurements with Caco-2 cell and algorithm predictions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 86, n. 2, p. 388-396, 2007.
- BELL, H. et al. Serum ferritin and transferrin saturation in patients with chronic alcoholic and non-alcoholic liver diseases. *Journal of Internal Medicine*, v. 236, n. 3, p.315-322, 1994.
- BEKRI, S. et al. Increased Adipose Tissue Expression of Hepcidin in Severe Obesity Is Independent From Diabetes and NASH. *Gastroenterology*, v. 131, n. 3, p. 788-796, 2006.
- BEZWODA, W. R. et al. Patterns of food iron absorption in iron-deficient white and indian subjects and in venesected haemochromatotic patients. *British Journal of Haematology*, v. 33, n. 3, p. 425-436, 1976.
- BLAIR, H. A. Voxelotor: First approval. *Drugs*, v. 80, n. 2, p. 209-215, 2020.
- BRANDHAGEN, D. J; FAIRBANKS, V. F.; BALDUS, W. Recognition and management of hereditary hemochromatosis. *American Family Physician*, v. 65, n. 5, p. 853-860, 2002.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes*. Brasília: ANVISA, 2002a. 142 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Aprova o regulamento técnico para a fortificação de farinhas de trigo e das farinhas de milho com ferro e ácido fólico*. Resolução n. 344, de 13 de dezembro de 2002b. Publicada no DOU n. 244 em 18 de dezembro de 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme – PNAIPDF*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2005.

BRASIL. Conselho Nacional de Saúde. Resolução nº 466, de 12 de dezembro de 2012. Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Poder Executivo, Brasília, DF, 12 de dezembro de 2012, p.59-62.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. *Programa Nacional de Suplementação de Ferro*. Manual de Condutas Gerais. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2013, 24 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. *O que se deve saber sobre herança genética*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014. 47 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). *Dispõe sobre o enriquecimento das farinhas de trigo e de milho com ferro e ácido fólico*. Resolução n.150, de 13 de abril de 2017. Publicada no DOU n. 73 em 17 de abril de 2017.

BRISSOT, P. et al. Ascorbic acid status in idiopathic hemochromatosis. *Digestion*, v. 17, n. 6, p. 479-487, 1978.

BRITTENHAM, G. M. Iron-chelating therapy for transfusional iron overload. *The New England Journal of Medicine*, v. 364, n. 2, p. 146-156, 2011.

BUNN, H. F. et al. Pulmonary hypertension and nitric oxide depletion in sickle cell disease. *Blood*, v. 116, n. 5, p. 687-692, 2010.

CANÇADO, R. D. Sobrecarga e quelação de ferro na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 316-326, 2007.

CARDOSO, J. D. *Fatores determinantes da concentração de hepcidina sérica em pacientes com anemia falciforme sem sobrecarga de ferro*. 2018. 58 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

CAXITO, F. A.; SILVA, A. Isótopos estáveis: fundamentos e técnicas aplicadas à caracterização e proveniência geográfica de produtos alimentícios. *Geonomos*, v. 23, n. 1, p. 10-17, 2015.

CHAPMAN, R. W. et al. Effect of ascorbic acid deficiency on serum ferritin concentration in patients with β -thalassemia major and iron overload. *Journal of Clinical Pathology*, v. 35, n. 5, p. 487-491, 1982.

- CHEN, Z. et al. High resolution inductively coupled plasma mass spectrometry allows rapid assessment of iron absorption in infants and children. *The Journal of Nutrition*, v. 135, n. 7, p. 1790-1795, 2005.
- CHIU, P. F.; SY, K.; CHANG, C. C. Vitamin C affects the expression of hepcidin and erythropoietin receptor in HepG2 cells. *Journal of Renal Nutrition: The Official Journal of the Council on Renal Nutrition of the National Kidney Foundation*, v. 22, n. 3, p. 373-376, 2012.
- CHUNG, B. et al. Leptin increases the expression of the iron regulatory hormone hepcidin in HuH7 Human Hepatoma Cells. *Journal of Nutrition*, v. 137, n. 11, p. 2366-2370, 2007.
- COATES, T. D. Physiology and pathophysiology of iron in hemoglobin-associated diseases. *Free Radical Biology and Medicine*, Nova Iorque, v. 72, [s.n.], p. 23-40, 2014.
- COATES, T. D.; WOOD, J. C. How we manage iron overload in sickle cell patients. *British Journal of Haematology*, v. 177, n. 5, p. 703-716, 2017.
- COHEN, A. et al. Effect of iron intake on control of body iron in patients with thalassemia major treated with Deferasirox (Exjade[®], ICL670). *Blood*, v. 106, n. 11, p. 822-822, 2005.
- COLEMAN, E.; INUSA, B. Sickle cell anemia: Targeting the role of fetal hemoglobin in therapy. *Clinical Pediatrics*, v. 46, n. 5, p. 386-391, 2007.
- CONRAN, N.; FRANCO-PENTEADO, C. F.; COSTA, F. F. Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin*, v. 33, n. 1, p.1-16, 2009.
- COOK, J. D. Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology*, v. 18, n. 2, p. 319-332, 2005.
- COOK, J. D. et al. Serum ferritin as a measure of iron stores in normal subjects. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 27, n. 7, p. 681-687, 1974.
- DARBARI, D. S. et al. Circumstances of Death in Adult Sickle Cell Disease Patients. *American Journal of Hematology*, v.81,n., p.858-863, 2006.
- DE ALARCON, P. A. et al. Iron absorption in the thalassemia syndromes and its inhibition by tea. *The New England Journal of Medicine*, v. 300, n. 1, p. 5 -8, 1979.
- DE DOMENICO, I.; WARD, D. M.; KAPLAN, J. Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders. *Journal of Molecular Cell Biology*, v. 9, n. 1, p. 72-81, 2008.
- DIAZ, M. et al. The efficacy of a local ascorbic acid-rich food in improving iron absorption from Mexican diets: a field study using stable isotopes. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 78, n. 3, p. 436-440, 2003.
- DONANGELO, C. M. et al. Iron and zinc absorption from two bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes in young women. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 17, p. 5137-5143, 2003.

DONOVAN, A.; ROY, C. N.; ANDREWS, N. C. The ins and outs of iron homeostasis. *Physiology*, [s.v.], n. 21, p. 115-123, 2006.

DUNN, L. L.; RAHMANTO, Y. S.; RICHARDSON, D. R. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends in cell biology*, v. 17, n. 2, p. 93-100, 2007.

ELALFY, M. S. et al. Role of vitamin C as an adjuvant therapy to different iron chelators in young β -thalassemia major patients: efficacy and safety in relation to tissue iron overload. *European Journal of Haematology*, v. 96, n. 3, p. 318-326, 2015.

ERLANDSON, M. E. et al. Studies on congenital hemolytic syndromes, IV. Gastrointestinal absorption of iron. *Blood*, v. 19, [s.n.], p.359-378, 1962.

EZEH, C. et al. Heparin, haemoglobin and ferritin levels in sickle cell anaemia. *European Journal of Haematology*, v. 74, n. 1, p. 86-88, 2005.

FAIRWEATHER-TAIT, S.; HURRELL, R. F. Bioavailability of mineral and trace elements. *Nutrition Research Reviews*, v. 9, n. 1, p. 295-324, 1996.

FERNANDEZ-BOYANAPALLI, R. F. et al. Impaired apoptotic cell clearance in CGD due to altered macrophage programming is reversed by phosphatidylserine-dependent production of IL-4. *Blood*, v. 113, n. 9, p. 2047-2055, 2009.

FERREIRA, S. L.; CORDEIRO, R. C. *Qualidade de vida e cuidados às pessoas com doença falciforme*. Salvador: EDUFBA, 2013. 169 p.

FERRIS, C. D. et al. Haem oxygenase-1 prevents cell death by regulating cell iron. *Nature Cell Biology*, v. 1, n. 13, p. 152-157, 1999.

FERTRIN, K. Y. et al. Erythropoiesis-driven regulation of hepcidin in human red cell disorders is better reflected through concentrations of soluble transferrin receptor rather than growth differentiation factor 15. *American Journal of Hematology*, v. 89, n. 4, p. 385-390, 2014.

FEUCHTBAUM, L. et al. Birth prevalence of disorders detectable through newborn screening by race/ethnicity. *Genetics in Medicine*, v. 14, n. 11, p. 937-945, 2012.

FIDLER, M. C. et al. Iron absorption from ferrous fumarate in adult women is influenced by ascorbic acid but not by Na₂EDTA. *British Journal of Nutrition*, v. 90, n. 6, p. 1081-1085, 2003.

FINCH, C. A. et al. Iron metabolism; utilization of intravenous radioactive iron. *Blood*, v. 4, p. 905-927, 1949.

FLANAGAN, J. et al. The relationship between hepcidin and iron overload in sickle cell anemia. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 48, n. 6, p. 615-615, 2009.

FLETCHER, L. M. et al. Excess alcohol greatly increases the prevalence of cirrhosis in hereditary hemochromatosis. *Gastroenterology*, v. 122, n. 2, p. 281-289, 2002.

FOMON, S. J.; ZIEGLER, E. E.; NELSON, S. E. Erythrocyte incorporation of ingested ^{58}Fe by 56-day-old breast-fed and formula-fed infants. *Pediatric Research*, v. 33, n. 6, p. 573-576, 1993.

FOMON, S. J. et al. Time course of and effect of dietary iron level on iron incorporation into erythrocytes by infants. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 3, p.p. 541-545, 2000.

FOWLER, C. Hereditary hemochromatosis: pathophysiology, diagnosis, and management. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, v. 20, n. 2, p. 191-201, 2008.

GABRIEL, A.; PRZYBYLSKI, J. Sickle-cell Anemia: A look at global haplotype distribution. *Nature Education*, v. 3, n. 3, p. 2, 2010.

GALANELLO, R. et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of ICL670, a new orally active iron-chelating agent in patients with transfusion-dependent iron overload due to β -thalassemia. *Journal of Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*, v. 43, n.6, p. 565-572, 2003.

GANZ, T. Heparin and its role in regulating systemic iron metabolism. *Hematology: American Society of Hematology Education Program*, v. 507, p. 29-35, 2006.

GANZ, T. Molecular Control of Iron Transport. *Journal of the American Society of Nephrology*, v. 18, n. 2, p. 394-400, 2007.

GANZ, T.; NEMETH, E. Iron imports. IV. Heparin and regulation of body iron metabolism. *American Journal of Physiology - Gastroenterology and Liver Physiology*, Bethesda, v. 290, n. 2, p. G199-203, 2006.

GANZ, T.; NEMETH, E. Heparin and iron homeostasis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1823, n. 9, p. 1434-1443, 2012.

GATTERMAN, N. The treatment of secondary hemochromatosis. *Deutsches Ärzteblatt International*, v. 106, n. 30, p. 499-504, 2009.

GERVASIO, A. P. G. et al. Eletroforese capilar acoplada à espectrometria com plasma: uma ferramenta eficiente para a especificação. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 65-74, 2003.

GIARDINA, P. J.; GRADY, R. W. Chelation therapy in beta-thalassemia: the benefits and limitations of desferrioxamine. *Seminars in Hematology*, v. 32, n. 4, p. 304-312, 1995.

GINÉ-ROSIAS, M. F. *Espectrometria de massa com fonte de plasma*. 1ª edição. Piracicaba: CPG/CENA/USP, 1999.

GOLOMBICK, T. et al. Effect of the ginger derivative, 6-shogaol, on ferritin levels in patients with low to intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome – a small, investigative study. *Clinical Medicine Insights: Blood Disorders*, v. 10, p. 1-4, 2017.

GREEN, R. A. et al. Body iron excretion in man: A collaborative study. *The American Journal of Medicine*, v. 45, n. 3, p. 336- 353, 1968.

GROSS, J. H. *Mass Spectrometry: A Textbook*. 2ª edição. Heidelberg: Springer, 2010.

GRÜNEWALD, S. T. F. *Avaliação morfofuncional do implante esplênico autógeno e sua relação com a histologia hepática em um modelo murino de injúria por paracetamol*. 2015. 63f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

HAN, W.; YU, K. N. Ionizing radiation, DNA double strand break and mutation. In: URBANO, K. V. *Advances in Genetics Research*. 4º volume. Estados Unidos da América: Nova Science Pub, 2011.

HANKINS, J. S. et al. R2* magnetic resonance imaging of the liver in patients with iron overload. *Blood*, v. 113, n. 20, p. 4853-4855, 2009.

HARMATZ, P. et al. Severity of iron overload in patients with sickle cell disease receiving chronic red blood cell transfusion therapy. *Blood*, v. 96, n. 1, p. 76-79, 2000.

HARRISON-FINDIK, D. D. et al. Alcohol metabolism-mediated oxidative stress down-regulates hepcidin transcription and leads to increased duodenal iron transporter expression. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 32, p. 22974-22982, 2006.

HEBBEL, R. P. Adhesive interactions of sickle erythrocytes with endothelium. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 100, supl. 11, S83-S86, 1997.

HENTZE, M. W.; MUCKENTHALER, M. U.; ANDREWS, N. C. Balancing acts: Molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell*, v. 117, n. 3, p. 285-297, 2004.

HENTZE, M. W. et al. Two to tango: Regulation of mammalian iron metabolism. *Cell*, v. 142, n. 1, p. 24-38, 2010.

HOFFBRAND, A. V.; TAHER, A.; CAPPELLINI, M. D. How I treat transfusional iron overload? *Blood*, v. 120, n. 18, p. 3657-3669, 2012.

HOPPE, M. R. *Iron absorption in man: diet modification and fortification*. 2008. 59 f. Tese (Doutorado em Nutrição Clínica) – Universidade de Gotemburgo, Gotemburgo, 2008.

HURRELL, R. F. Bioavailability – a time for reflection. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, v. 72, n. 1, p. 5-6, 2002.

HURRELL, R. F. et al. Meat protein fractions enhance nonheme iron absorption in humans. *The Journal of Nutrition*, v. 136, n. 11, p.2808-2812, 2006.

HUTCHALEELAHA, A. et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of voxelotor (GBT440) in healthy adults and patients with sickle cell disease. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 85, n. 6, p. 1290-1302, 2019.

HYACINTH, H. I.; GEE, B. E.; HIBBERT, J. M. The role of nutrition in sickle cell disease. *Nutrition and Metabolic Insights*, v. 3, p. 57-67, 2010.

IMAM, M. U et al. Antioxidants mediate both iron homeostasis and oxidative stress. *Nutrients*, v. 9, n. 7, p. 3-19, 2017.

INATI, A. et al. Iron overload indices rise linearly with transfusion rate in patients with sickle cell disease. *Blood*, v. 115, n. 14, p. 2980-2981, 2010.

INATI, A.; KHORIATY, E.; MUSALLAM, K. M. Iron in sickle-cell disease: What have we learned over the years? *Pediatric Blood Cancer*, v.56, n.2, p. 182-190, 2011.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). *Dietary Reference Intakes (DRI) for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc*. Washington DC: National Academy Press; 2001.

INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY (IAEA). *Assessment of iron bioavailability in humans using stable iron isotope techniques*. IAEA Human Health Series. N 21. Editora: International Atomic Energy Agency. Viena, 2012. 77 p.

IOANNOU, G. N. et al. The effect of alcohol consumption on the prevalence of iron overload, iron deficiency, and iron deficiency anemia. *Gastroenterology*, v. 126, n. 5, p. 1293-1301, 2004.

JENSEN, N. M. et al. Low-dose oral iron absorption test: establishment of a reference interval. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, v. 58, n. 6, p. 511-519, 1998.

JOOSTEN, E; VANDER ELST, B.; BILLEN, J. Small-dose oral iron absorption test in anaemic and non-anaemic elderly hospitalized patients. *European Journal of Haematology*, v. 58, n. 2, p. 99-103, 1997.

JOSEPHSON, C. D. et al. Transfusion in the patient with sickle cell disease: A critical review of the literature and transfusion guidelines. *Transfusion Medicine Reviews*, v. 21, n. 2, p. 118-133, 2007.

JUNQUEIRA-FRANCO, M. V. M. et al. Iron absorption from beans with different contents of iron, evaluated by stable isotopes. *Clinical Nutrition ESPEN*, v. 25, [s.n.], p. 121-125, 2018.

KAITHA, S.; BASHIR, M.; ALI, T. Iron deficiency anemia in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, v. 6, n. 3, p. 62-72, 2015.

KALTWASSER, J. P. et al. Clinical trial on the effect of regular tea drinking on iron accumulation in genetic haemochromatosis. *Gut*, v. 43, n. 5, p. 699-704, 1998.

KARAFIN, M. S. et al. Erythropoietic drive is the strongest predictor of hepcidin level in adults with sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v, 55, n. 4, p. 304-307, 2015.

KASSIM, A. et al. Iron deficiency in Yemeni patients with sickle-cell disease. *Eastern Mediterranean Health Journal*, v.18, n.3, p.241-245, 2012.

- KASTENMAYER, P. et al. A double stable isotope technique for measuring iron absorption in infants. *The British Journal of Nutrition*, v. 71, n. 3, p. 411-424, 1994.
- KATO, G. et al. Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. *Blood*, v. 107, n. 6, p. 2279-2285, 2006.
- KATO, G. J. et al. Sickle cell disease. *Nature Reviews*, v. 4, n. 18010, p.1-22, 2018.
- KAUTZ, L. et al. Identification of erythroid regulator of iron metabolism. *Nature Genetics*, v. 46, n. 7, p. 678-684, 2014.
- KEARNEY, S. L. et al. Urinary Heparin in Congenital Chronic Anemias. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 48, n. 1, p. 57-63, 2007.
- KOBUNE, M. et al. Establishment of a simple test for iron absorption from the gastrointestinal tract. *International Journal of Hematology*, v. 93, n. 6, p. 715-719, 2011.
- KOHGO, Y. et al. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *International Journal of Hematology*, v. 88, n. 1, p. 7-15, 2008.
- KING, J.; RAYNOLDS, W. L.; MARGEN, S. Absorption of stable isotopes of iron, copper, and zinc during oral contraceptive use. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 31, n. 7, p. 1198-1203, 1978.
- KING, L.; REID, M.; FORRESTER, T. E. Iron Deficiency Anaemia in Jamaican Children, Aged 1–5 Years, with Sickle Cell Disease. *West Indian Medical Journal*, v.54, n.5, p.292-296, 2005.
- KNUTSON, M.; WESSLING-RESNICK, M. Iron metabolism in the reticuloendothelial system. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, v. 38, n. 1, p. 61-88, 2003.
- KRAYENBUEHL, P. A. et al. Hereditary hemochromatosis is reflected in the iron isotope composition of blood. *Blood*, v. 105, n. 10, p. 3812-3816, 2005
- KROOT, J. J. et al. Regulation of serum hepcidin levels in sickle cell disease. *Haematologica*, v. 94, n. 6, p. 885-887, 2009.
- KRUG, F. J. et al. Guia prático de perguntas e respostas sobre ICP-OES, ICP-MS e preparo de amostras. São Paulo: Embrapa Pecuária Sudeste, 2001.
- LABRANCHE, R. et al. Liver iron quantification with MR imaging: a primer for radiologists. *Radiographics*, v. 38, n.2, p. 392-412, 2018.
- LANE, D. J. R. et al. Duodenal cytochrome *b* (DCYTB) in iron metabolism: an update on function and regulation. *Nutrients*, v. 7, n. 4, p. 2274-2296, 2015.
- LANG, E.; LANG, F. Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, v. 39, p. 35-42, 2015.

LEONARD, S. S.; HARRIS, G. K.; SHI, X. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 37, n. 12, p. 1921-1942, 2004.

LOBBES, H. et al. Effect of procyanidin on dietary iron absorption in hereditary hemochromatosis and in dysmetabolic iron overload syndrome: A crossover double-blind randomized controlled trial. *Clinical Nutrition*, v. 39, n. 1, p. 97-103, 2020.

LOHMAN, T. G.; ROCHE, A. F.; MARTORELL, R. *Anthropometric standardization reference manual*. Champaign: Human Kinetics Publishers, 1988.

LOWMAN, J. T; KRIVIT, W. New in vivo tracer method with the use of nonradioactive isotopes and activation analysis. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v. 61, [s.n.], p. 1042-1048, 1963.

LYNCH, S. R. et al. Accelerated oxidative catabolism of ascorbic acid in siderotic Bantu. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 20, n. 6, p. 641-647, 1967.

LYNCH, S. R.; SKIKNE, B. S.; COOK, J. D. Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood*, v. 74, n. 6, p. 2187-2193, 1989.

MANDAL, D. et al. Caspase 3-mediated Proteolysis of the N-terminal Cytoplasmic Domain of the Human Erythroid Anion Exchanger 1 (Band 3). *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, n. 52, p. 52551-52558, 2003.

MANDAL, D. et al. Fas-, caspase 8-, and caspase 3-dependent signaling regulates the activity of the aminophospholipid translocase and phosphatidylserine externalization in human erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 280, n. 47, p. 39460-39467, 2005.

MANGAONKAR, A. A. et al. Plasma biomarkers of iron regulation, overload, and inflammation in sickle cell disease. *Blood*, v. 124, n. 21, p. 1380, 2014.

MANGAONKAR, A. A. et al. Regulation of iron homeostasis through the erythroferrone-hepcidin axis in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 189, n. 6, p. 1204-1209, 2020.

MAZUMDAR, M. et al. Preventing Stroke Among Children With Sickle Cell Anemia: An Analysis of Strategies That Involve Transcranial Doppler Testing and Chronic Transfusion. *Pediatrics*, v. 20, n. 4, p. e1107-1116, 2007.

MC DERMID, J. M.; LÖNNERDAL, B. Iron. *Advances in Nutrition*, v. 3, n.4, p. 532-533, 2012.

MCKIE, A. T. The role of Dcytb in iron metabolism: an update. *Biochemical Society Transactions*, v. 36, pt. 6, p. 1239-1241, 2008.

MELONI, A. et al. Cardiac iron overload in sickle-cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 89, n. 7, p. 678-683, 2014.

MENA, N. P. et al. Heparin inhibits apical iron uptake in intestinal cells. *American Journal of Physiology - Gastroenterology and Liver Physiology*, v. 294, n. 1, p. G192-198, 2008.

MERLE, U. et al. The Iron Regulatory Peptide Hepcidin is Expressed in the Heart and Regulated by Hypoxia and Inflammation. *Endocrinology*, v. 148, n. 6, p. 2663-2668, 2007.

MILDER, M. S.; COOK, J. D.; FINCH, C. A. Influence of food iron absorption on the plasma iron level in idiopathic hemochromatosis. *Acta Haematologica*, v. 60, n. 2, p. 65-75, 1978.

MILMAN, N.; KIRCHHOFF, M. Relationship between serum ferritin, alcohol intake, and social status in 2235 Danish men and women. *Annals of Hematology*, v. 72, n. 3, p. 145-151, 1996.

MODELL, C. B.; BECK, J. Long-term desferrioxamine therapy in thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 232, n. 0, p. 201-210, 1974.

MODELL, B.; DARLISON, M. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bulletin of the World Health Organization*, [Genebra], v. 86, n. 6, p. 480-487, 2008.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*, v. 6, n. 7, p. e1000097.

MUCKENTHALER, M. U. et al. A red carpet for iron metabolism. *Cell*, v. 168, n. 3, p. 344-361, 2017.

MUCKENTHALER, M. U.; GALY, B.; HENTZE, M. W. Systemic iron homeostasis and the iron-responsive element/iron-regulatory protein (IRE/IRP) regulatory network. *Annual Review of Nutrition*, [s.v.], n. 28, p. 197-213, 2008.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. National Heart, Lung, And Blood Institute. Division of Blood Diseases and Resources. *The Management of Sickle Cell Disease*. 4 ed. Bethesda, MD: NIH Publication n. 02-2117, 2002.

NDEFO, U. A. et al. Pharmacological management of sickle cell disease. *Pharmacy & Therapeutics*, v. 33, n. 4, p. 238 – 243, 2008.

NEMETH, E. et al. Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. *Blood*, v.101, n.7, p.2461-2463, 2003.

NEMETH, E. et al. Hepcidin Regulates Cellular Iron Efflux by Binding to Ferroportin and Inducing Its Internalization. *Science*, v.306, n.5704, p.2090-2093, 2004.

NEMETH, E. Hepcidin in β -thalassemia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, n. 1202, p. 31-35, 2010.

NICOLAS, G. et al. The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia and inflammation. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 110, n. 7, p. 1037-1044, 2002.

NNODIM, J. et al. Hepcidin and erythropoietin level in sickle cell disease. *British Journal of Medicine & Medical Research*, v. 8, n. 3, p. 261-265, 2015.

O'BRIEN, R. T. Ascorbic acid enhancement of desferrioxamine-induced urinary iron excretion in thalassemia major. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 232, n. 0, p. 221-225, 1974.

O'BRIEN, K. O. et al. Prenatal iron supplements impair zinc absorption in pregnant Peruvian women. *The Journal of Nutrition*, v. 130, n. 9, p. 2251-2255, 2000.

ODIÈVRE, M. H. et al. Pathophysiological insights in sickle cell disease. *Indian Journal of Medical Research*, v. 134, n. 4, p. 532-537, 2011.

OHEMENG, A.; BOADU, I. The role of nutrition in pathophysiology and management of sickle cell disease among children: a review of literature. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 58, n. 14, p. 2299-2305, 2018.

OHENE-FREMPONG, K. et al. Cerebrovascular Accidents in Sickle Cell Disease: Rates and Risk Factors. *Blood*, v. 91, n. 1, p. 288-294, 1998.

OLIVIERI, N. F. Progression of Iron Overload in Sickle Cell Disease. *Seminars in Hematology*, v. 31, n. 1, Suppl. 1, p.57-62, 2001.

OMENA, J. et al. Serum hepcidin concentration in individuals with sickle cell anemia: basis for the dietary recommendation of iron. *Nutrients*, v. 10, n. 4, p. 1-9, 2018.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). *WHO expert committee on Physical status: The use and interpretation of anthropometry*. Genebra: [s.n.], 1995.

PARK, C. H. et al. Heparin: a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n.11, p.7806-7810, 2001.

PEGELOW, C. H. et al. Risk of recurrent stroke in patients with sickle cell disease treated with erythrocyte transfusions. *The Journal of Pediatrics*, v. 126, n. 6, p. 896-899, 1995.

PETERS, M. D. J. et al. Capítulo 11: *Scoping Reviews* (2020 version). In: AROMATARI, E. S.; MUNN, Z (editores). *JBIManual for Evidence Synthesis*. JBI, 2020. Disponível em: < <https://synthesismanual.jbi.global> > Acesso em 7 de Junho de 2020.

PETRY, N. et al. Stable iron isotope studies in Rwandese women indicate that the common bean has limited potential as a vehicle for iron biofortification. *The Journal of Nutrition*, v. 142, n. 3, p. 492-497, 2012.

PIGEON, C. et al. A New Mouse Liver-specific Gene, Encoding a Protein Homologous to Human Antimicrobial Peptide Heparin, Is Overexpressed during Iron Overload. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 11, p. 7811-7819, 2001.

PIEL, F. B. et al. Global burden of sickle cell anaemia in children under five, 2010-2050: modelling based on demographics, excess mortality, and interventions. *Plos Medicine*, v. 10, n. 7, p. e1001484, 2013.

PIPERNO, A. Classification and diagnosis of iron overload. *Haematologica*, v. 83, n. 5, p. 447-455, 1998.

PIPERNO, A; PELUCCHI, S.; MARIANI, R. Inherited iron overload disorders. *Translational Gastroenterology and Hepatology*, v. 5, 25 p., 2020.

PLATT, O. S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. *The New England Journal of Medicine*, v. 358, n. 13, p. 1362-1369, 2008.

PORTER, J. B. Practical management of iron overload. *British Journal of Haematology*, v. 115, n. 2, p. 239-252, 2001.

PORTER, J. B.; GARBOWSKI, M. The Pathophysiology of Transfusional Iron Overload. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 28, n. 4, p. 683-701, 2014.

POWELL, L. W.; SECKINGTON, R. C.; DEUGNIER, Y. *Lancet*, v. 388, n. 10045, p. 706-716, 2016.

RACHMILEWITZ, E.A; GIARDINA, P. J. How I treat thalassemia. *Blood*, v. 118, n. 13, p. 3479-3488, 2011.

RAJAGOPAL, A. et al. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. *Nature*, v. 453, n. 7198, p. 1127-1131, 2008.

REED, J. D.; REDDING-LALLINGER, R.; ORRINGER, E. P. Nutrition and sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 24, n. 4, p. 441-455, 1987.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, M. T. Sickle-cell disease. *Lancet*, v. 376, n. 9757, p. 2018-2031, 2010.

REMACHA, A. et al. Guidelines on haemovigilance of post-transfusional iron overload. *Blood Transfusion*, v. 11, n. 1, p. 128-139, 2013.

RHEA, J. M.; MOLINARO, R. Pathology consultation on HbA1c methods and inferences. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 141, n. 1, p. 5-16, 2014.

RINGELHANN, B.; KONOTEY-AHULU, F.; DODU, S. R. Studies on iron metabolism in sickle cell anaemia, sickle cell haemoglobin C disease, and haemoglobin C disease using a large volume liquid scintillation counter. *Journal of clinical pathology*, v. 23, n. 2, p. 127-134, 1970.

RODRIGUES, P. C. et al. Iron deficiency in Brazilian infants with sickle cell disease. *Jornal de Pediatria*, v.87, n.5, p.405-411, 2011.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, P. et al. Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochimica Acta Part B*, v. 60, n. 2, p. 151-207, 2005.

ROE, MA et al. Plasma hepcidin concentrations significantly predict interindividual variation in iron absorption in healthy men. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 89, n. 4, p. 1088-1091, 2009.

ROTHER, R. P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: A novel mechanism of human disease. *Journal of the American Medical*

Association, v. 6, n 13, p. 1653-1662, 2005.

ROUAULT, T. A. Hepatic iron overload in alcoholic liver disease: why does it occur and what is its role in pathogenesis?. *Alcohol*, v. 30, n. 2, p. 103-106, 2003.

RUIVARD, M. et al. Iron absorption in dysmetabolic iron overload syndrome is decreased and correlates with increased plasma hepcidin. *Journal of Hepatology*, v. 50, n. 6, p. 1219-1225, 2009.

SARANTOS, K. e al. Vitamin C in patients on long-term deferasirox without supplementation. *Blood*, v. 112, n. 11, p. 1858, 2008.

SCHULZ, E. J.; SWANEPOEL, H. Scorbatic pseudoscleroderma: an aspect of Bantu siderosis. *South African Medical Journal*, v. 36, p. 367-372, 1962.

SCOTET, V. et al. Hereditary hemochromatosis: Effect of excessive alcohol consumption on disease expression in patients homozygous for the C282Y mutation. *American Journal of Epidemiology*, v. 158, n. 2, p. 129-134, 2003.

SCHAER, D. J. *et al.* Hemolysis and free hemoglobin revisited: Exploring hemoglobin and heme scavengers as a novel class of therapeutic proteins. *Blood*, v. 21, n. 8, p. 1276-1284, 2013.

SHARP, P.; SRAI, S. K. Molecular mechanisms involved in intestinal iron absorption. *World Journal of Gastroenterology*, v. 13, n. 35, p. 4716-4724, 2007.

SHEN, J. et al. Lack of difference in hepcidin levels in sickle cell anemia and sickle cell beta thalassemia. *Blood*, v. 126, n. 23, p. 4591, 2015.

SKIKNE, B. S. Serum transferrin receptor. *American Journal of Hematology*, v. 83, n. 11, p. 872-875, 2008.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. *Princípios de análise instrumental*. 5ª edição. Bookman: Porto Alegre, 2002.

SMILEY, D.; DAGOGO-JACK, S.; UMPIERREZ, G. Therapy insight: metabolic and endocrine disorders in sickle cell disease. *Nature Clinical Practice: Endocrinology & Metabolism*, v. 4, n. 2, p. 102-109, 2008.

SODDY, F. Intra-atomic charge. *Nature*, v. 92, [s. n.], p. 399-400, 1913.

ST. PIERRE, T. G. et al. Noninvasive measurement and imaging of liver iron concentrations using proton magnetic resonance. *Blood*, v. 105, n. 2, p. 855-861, 2005.

STEINBERG, M. H. Predicting clinical severity in sickle cell anemia. *British Journal of Haematology*, v. 129, n. 4, p. 465-481, 2005.

STEINBICKER, A. U.; MUCKENTHALER, M. U. Out of Balance: Systemic Iron Homeostasis in Iron-Related Disorders. *Nutrients*, v. 5, n. 8, p. 3034-3061, 2013.

- STEINHAUSER, S. et al. Complex formation of ICL670 and related ligands with Fe^{III} e Fe^{II}. *European Journal of Inorganic Chemistry*, v. 2004, n. 21, p. 4177-4192, 2004.
- SULTANA, C. et al. Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*, v. 92, n. 10, p. 3924-3935, 1998.
- TAKAMI, T.; SAKAIDA, I. Iron regulation by hepatocytes and free radicals. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 48, n. 2, p. 103-106, 2011.
- TANCABELIC, J. et al. Serum transferrin receptor as a marker of erythropoiesis suppression in patients on chronic transfusion. *American Journal of Hematology*, v. 60, n. 2, p. 121-125, 1999.
- TAVILL, A. S. et al. Diagnosis and Management of Hemochromatosis. *Hepatology*, v. 33, n. 5, p. 1321-1328, 2001.
- TEIXEIRA, T. V. *Avaliação da ingestão de ferro em adultos com anemia falciforme*. 2020. 63 f. Dissertação (Mestrado em Alimentação, Nutrição e Saúde) – Instituto de Nutrição, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.
- TELEN, M. J. Beyond hydroxyurea: new and old drugs in the pipeline for sickle cell disease. *Blood*, v. 127, n. 7, p. 810-819, 2016.
- TEWARI, S. et al. Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica*, v. 100, n. 9, p. 1108-1116, 2015.
- THEURL, I. et al. Autocrine formation of hepcidina induces iron retention in human monocytes. *Blood*, v. 111, n. 4, p. 2392-2399, 2008.
- THURET, I. Post-transfusional iron overload in the haemoblonipathies. *Comptes Rendus Biologies*, v. 336, n. 3, p. 164-172, 2013.
- VAN DEN HEUVEL, E. G. H. M. et al. A new method to measure iron absorption from the enrichment of ⁵⁷Fe and ⁵⁸Fe in Young erythroid cells. *Clinical Chemistry*, v. 44, n. 3, p. 649-654, 1998.
- VICHINSKY, E. et al. The Diagnosis of Iron Deficiency Anemia in Sickle Cell Disease. *Blood*, v.58, n.5, p.963-968, 1981.
- VILLELA, N. B.; ROCHA, R. *Manual básico para atendimento ambulatorial em nutrição*. 2ª edição revisada. Salvador: EDUFBA, 2008, 120 p.
- VON BLANCKENBURG, F. et al. An iron stable isotope comparison between human erythrocytes and plasma. *Metallomics*, v. 6, n. 11, p. 2052-2061, 2014.
- VOSKOU, S. et al. Oxidative stress in β-thalassaemia and sickle cell disease. *Redox Biology*, v. 6, p. 226-239, 2015.

- WALCZYK, T.; von BLANCKENBURG, F. Natural iron isotope variations in human blood. *Science*, v. 295, n. 5562, p. 2065-2066, 2002.
- WALCZYK, T.; von BLANCKENBURG, F. Deciphering the iron isotope message of the human body. *International Journal of Mass Spectrometry*, v. 242, n. 2-3, p. 117-134, 2005.
- WALTERS, G. O. et al. Iron absorption in normal subjects and patients with idiopathic haemochromatosis: Relationship with serum ferritin concentration. *Gut*, v. 16, n. 3, p. 188-192, 1975.
- WANG, Y. et al. Sickle cell disease incidence among newborns in New York State by maternal race/ethnicity and nativity. *Genetics in Medicine*, v. 15, n. 3, p. 222-228, 2013.
- WARD, R. An update on disordered iron metabolism and iron overload. *Hematology*, v. 15, n. 5, p. 311-317, 2010.
- WARE, R. E.; AYGUN, B. Advances in the use of hydroxyurea. *Hematology/ American Society of Hematology Education Program*, [s.v.], [s.n.], p. 62-69, 2009.
- WARE, R. E. How I use hydroxyurea to treat young patients with sickle cell anemia. *Blood*, v. 115, n. 26, p. 5300-5311, 2010.
- WHITFIELD, J. B. et al. Effects of alcohol consumption on indices of iron stores and of iron stores on alcohol intake markers. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, v. 25, n. 7, p. 1037-1045, 2001.
- WORWOOD, M. Serum transferrin receptor assays and their application. *Annals of Clinical Biochemistry*, v. 39, Pt. 3, p. 221-230, 2002.
- XAVIER, A. M. et al. Marcos da história da radioatividade e tendências atuais. *Química Nova*, v. 30, n. 1, p.83-91, 2007.
- ZENNADI, R. et al. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. *Blood*, v. 112, n. 8, p. 3474-3483, 2008.
- ZAGO, M. A. Anemia Falciforme e Doenças Falciformes. In: BRASIL. *Manual de doenças mais importantes, por razões étnicas, na população brasileira afro-descendente*. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2001. p. 13-35.
- ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p.207-214, 2007.
- ZEMEL, B. S. et al. Effect of zinc supplementation on growth and body composition in children with sickle cell disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 75, n. 2, p. 300-307, 2002.
- ZHANG, A. S.; ENNS, C. A. Molecular mechanisms of normal iron homeostasis. *Hematology/ American Society of Hematology Education Program*, p. 207-214, 2009.

ZHUANG, X. et al. Ginger-derived nanoparticles protect against alcohol-induced liver damage. *Journal of Extracellular Vesicles*, n. 4, p. 1-18. 2015.

ZIMMERMANN, M. B. et al. Plasma hepcidin is a modest predictor of dietary iron bioavailability in humans, whereas oral iron loading, measured by stable-isotope appearance curves, increases plasma hepcidin. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 90, n. 5, p. 1280-1287, 2009.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para os Participantes oriundos do Instituto de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio)

Termo de Assentimento e Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Sobrecarga de ferro em pessoas com doença falciforme: Avaliação da absorção intestinal deste nutriente**”. O objetivo deste estudo é avaliar a absorção de ferro ingerido por via oral em pacientes com doença falciforme.

Neste procedimento, será solicitado que você permaneça em jejum por 12 horas e que possa comparecer ao Ambulatório de Nutrição do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio), no dia e horário previamente agendados e dentro de sua disponibilidade.

Primeiramente, seu sangue será coletado em jejum, e, após este processo, você deverá receber um copo de suco de laranja com adição de um tipo de ferro que já é naturalmente presente em alimentos em quantidades muito pequenas, e, portanto, não oferece risco à sua saúde. O uso deste tipo de ferro ajudará a saber o quanto de ferro foi absorvido pelo seu organismo. Após 14 dias, solicitaremos que você retorne para uma nova coleta de sangue, desta vez no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A coleta de sangue será realizada por um profissional de saúde habilitado a empregar os procedimentos adequados para não haver riscos. Entretanto, observamos que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematomas, desmaio e infecção no local da punção.

Dispomos de uma ajuda de custo para deslocamento de R\$ 30, entregue na segunda coleta de sangue desta pesquisa.

É importante que você tenha conhecimento de que sua participação na pesquisa é voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem penalidades e/ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de interrupção na participação do estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Esperamos que os resultados encontrados nesta pesquisa possam nos ajudar a entender melhor como é controlada a absorção de ferro no intestino de pessoas com a doença falciforme e que, desta forma, auxiliem na elaboração de orientações nutricionais voltadas para este público.

Quando os resultados estiverem prontos, agendaremos uma consulta onde você receberá cópia de todos os seus resultados e os encaminharemos para os especialistas, se houver necessidade.

As informações obtidas nesta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados serão divulgados de forma a impossibilitar sua identificação.

Você ou seus familiares podem fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Para isto, você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone das pesquisadoras principais: Vanessa Monteiro Voll [(21) 99789-4844]. Juliana Omena Braga de Mendonça [(21) 99614-7577] e Cláudia Cople [(21) 98854-9021]. Se você tiver perguntas com relação aos seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti – CEP HEMORIO, situado à Rua Frei Caneca, n.8, sala 324 – Centro – Rio de Janeiro, CEP 20211-030, telefone (21) 2299-9442, Ramal 2215 ou também pelo email cep@hemorio.rj.gov.br.

Declaro que eu pude questionar sobre todos os aspectos do estudo e que o (a) investigador (a) me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes, a qual li e compreendi, e me deu plena liberdade para decidir a respeito da minha participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em participar deste estudo e informar a equipe de pesquisa responsável por mim sobre qualquer anormalidade observada. Estou ciente de que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar, e de que a minha identidade jamais será publicada. Os dados coletados poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador. Atesto que estou recebendo uma cópia assinada deste Termo.

_____ Data: ___/___/___
(Assinatura do Paciente ou Pessoa autorizada a consentir pelo paciente)

(Nome do Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ Data: ___/___/___
(Assinatura de Vanessa Monteiro Voll ou Juliana Omena)

APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Para os Participantes sem a Doença Falciforme

Termo de Assentimento e Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado para participar da pesquisa “**Sobrecarga de ferro em pessoas com doença falciforme: Avaliação da absorção intestinal deste nutriente**”. O objetivo deste estudo é avaliar a absorção de ferro ingerido por via oral em pacientes com doença falciforme.

Neste procedimento, será solicitado que você permaneça em jejum por 12 horas e que possa comparecer ao Laboratório Interdisciplinar de Avaliação do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), nos dias e horários previamente agendados e dentro de sua disponibilidade.

Primeiramente, seu sangue será coletado em jejum, e, após este processo, você deverá receber um copo de suco de laranja com adição de um tipo de ferro que já é naturalmente presente em alimentos em quantidades muito pequenas, e, portanto, não oferece risco à sua saúde. O uso deste tipo de ferro ajudará a saber o quanto de ferro foi absorvido pelo seu organismo. Após 14 dias, solicitaremos que você retorne para uma nova coleta de sangue, desta vez no Laboratório Interdisciplinar de Avaliação do Instituto de Nutrição da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

A coleta de sangue será realizada por um profissional de saúde habilitado a empregar os procedimentos adequados para não haver riscos. Entretanto, observamos que há a possibilidade de ocorrer riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematomas, desmaio e infecção no local da punção. Após os procedimentos de coleta de sangue, serão oferecidos a você lanches.

Dispomos de uma ajuda de custo para deslocamento de R\$ 30, entregue na segunda coleta de sangue desta pesquisa.

É importante que você tenha conhecimento de que sua participação na pesquisa é voluntária e de que você pode recusar-se a participar ou interromper a sua participação a qualquer momento, sem penalidades e/ou perda de benefícios aos quais você tem direito. Em caso de interrupção na participação do estudo, a equipe assistente deve ser comunicada e a coleta de amostras para os exames relativos ao estudo será imediatamente interrompida.

Esperamos que os resultados encontrados nesta pesquisa possam nos ajudar a entender melhor como é controlada a absorção de ferro no intestino de pessoas com a doença falciforme e que, desta forma, auxiliem na elaboração de orientações nutricionais voltadas para este público.

Quando os resultados estiverem prontos, agendaremos uma consulta onde você receberá cópia de todos os seus resultados e os encaminharemos para os especialistas, se houver necessidade.

As informações obtidas nesta pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados serão divulgados de forma a impossibilitar sua identificação.

Você ou seus familiares podem fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Para isto, você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone das pesquisadoras principais: Vanessa Monteiro Voll [(21) 99789-4844]. Juliana Omena Braga de Mendonça [(21) 99614-7577] e Cláudia Cople [(21) 98854-9021]. Se você tiver perguntas com relação aos seus direitos como participante do estudo, também pode contar com um contato imparcial, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti – CEP HEMORIO, situado à Rua Frei Caneca, n.8, sala 324 – Centro – Rio de Janeiro, CEP 20211-030, telefone (21) 2299-9442, Ramal 2215 ou também pelo email cep@hemorio.rj.gov.br.

Declaro que eu pude questionar sobre todos os aspectos do estudo e que o (a) investigador (a) me entregou uma cópia da folha de informações para os participantes, a qual li e compreendi, e me deu plena liberdade para decidir a respeito da minha participação nesta pesquisa.

Depois de tal consideração, concordo em participar deste estudo e informar a equipe de pesquisa responsável por mim sobre qualquer anormalidade observada. Estou ciente de que sou livre para sair do estudo a qualquer momento, se assim desejar, e de que a minha identidade jamais será publicada. Os dados coletados poderão ser examinados por pessoas envolvidas no estudo com autorização delegada do investigador. Atesto que estou recebendo uma cópia assinada deste Termo.

_____ Data: ____/____/____

(Assinatura do Paciente ou Pessoa autorizada a consentir pelo paciente)

(Nome do Paciente – letra de forma)

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo paciente.

_____ Data: ____/____/____

(Assinatura de Vanessa Monteiro Voll ou Juliana Omena)

APÊNDICE C – Ficha Clínica da Pesquisa de Participantes com a Doença Falciforme



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO – INSTITUTO DE NUTRIÇÃO
NUTRIFAL/AMB. NUTRIÇÃO EM HEMATOLOGIA (HUPE) – AMB. DE NUTRICAÇÃO (HEMORIO)



FICHA CLÍNICA DA PESQUISA – PARTICIPANTES COM DOENÇA FALCIFORME

Matrícula:	NFORM:
------------	--------

I. Identificação do questionário

Nome Completo do Paciente:
Endereço:
Telefones para contato:
E-mail:
Procedência do Paciente 1. HUPE 2. HEMORIO 3. IPPMG 4. Outros _____ __
Data de Nascimento __ _ __ / __ _ __ / __ _ __ _ __
Data da Entrada na Pesquisa __ _ __ / __ _ __ / __ _ __ _ __
Idade __ _ __ e _____ meses
Sexo 1. Masc 2. Fem __
Qual é sua cor/etnia 1. Branca 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena __
Horário de Início da entrevista __ _ __ h __ _ __ min

II. Entrevista

<p>1. Sabe seu genótipo? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>2. Possui alguma outra doença além da doença falciforme? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>3. Você já fez alguma cirurgia? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>4. Você teve algum problema de saúde nas últimas 3 semanas? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>5. Você esteve internado há menos de 2 semanas? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual foi o motivo? _____</p>
<p>6. Você teve algum tipo de infecção nos últimos 2 meses? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>7. Você fez/faz uso de algum tipo de suplementação de ferro? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual a dosagem? _____</p> <p>Há quanto tempo faz? _____</p> <p>Se já fez e não faz mais, há quanto tempo parou? _____</p> <p>Se já fez e não faz mais, por quanto tempo usou? _____</p>
<p>8. Você tomou algum tipo de suplementação vitaminas ou de minerais há menos de 2 meses (com exceção do ácido fólico)? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual(is)? _____</p> <p>Há quanto tempo? _____</p>

<p>9. Você já teve alguma orientação para restringir um determinado tipo de alimento? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, qual(is)? _____ Quem orientou? _____</p>
<p>10. Nos últimos 6 meses, você teve vontade de comer algo que não fosse alimento? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, o que? _____</p>
<p>11. Já realizou alguma transfusão sanguínea? 1. Sim 2. Não ___ 12. Já realizou troca sanguínea? 1. Sim 2. Não ___ Qual a frequência da transfusão? _____ Qual a frequência da troca sanguínea? _____ Quando foi a 1ª vez que você realizou uma transfusão sanguínea? _____ Quando foi a 1ª vez que você realizou uma troca sanguínea? _____ Ao longo da vida, quantas transfusões você já realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () > 15 Ao longo da vida, quantas trocas você já realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () > 15 Nos últimos 12 meses, quantas transfusões você realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () > 15 Nos últimos 12 meses, quantas trocas você realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () > 15 Qual foi a última vez que fez transfusão? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____ Qual a última vez que fez troca sanguínea? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____</p>
<p>13. Você usa hidroxiureia (HU)? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, há quanto tempo? _____</p>
<p>14. Você fez/ faz o uso de algum quelante de ferro? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, qual quelante e qual dosagem? _____ Há quanto tempo? _____ Se não faz mais o uso, há quanto tempo parou? _____ Se não faz mais o uso, por quanto tempo utilizou? _____</p>
<p>15. A que horas que você comeu pela ultima vez? __ _ _ h __ _ _ min</p>
<p>15. Você teve febre ontem? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, Quantos graus? _____</p>
<p>16. Você faz uso <u>regular</u> de bebida alcoólica? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, qual? _____ Qual a frequência? () Diariamente () Aos finais de semana () Quinzenalmente () Uma vez/mês</p>
<p>Somente para mulheres</p> <p>17. Qual a idade da menarca? _____ () Ainda não menstruou 18. Você ainda menstrua? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, qual o dia do início da última menstruação? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____ Se Não, qual o mês /ano (ou quantos anos tinha) em que parou de menstruar? __ _ _ / __ _ _ _ _ _ _ Se Não, faz ou fez uso de reposição hormonal? 1. Sim, qual o período? _____ 2. Não 3. Não mas já fiz, qual o período? _____ ___ Se Sim, utiliza (ou) qual tipo de reposição? _____</p>
<p>Somente para mulheres</p> <p>19. Usa anticoncepcional? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, por quanto tempo? _____ Se Sim, qual a marca/nome? _____ Se Não, já usou no passado? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, por quanto tempo usou no passado? _____</p>
<p>20. Usa DIU? 1. Sim 2. Não ___ Se Sim, de qual tipo? () Hormonal () DIU com cobre Há quanto tempo? _____ Se Não, já usou no passado? 1. Sim 2. Não ___ De qual tipo? () Hormonal () DIU com cobre Por quanto tempo utilizou? _____ Há quanto tempo parou? _____</p>

Durante os últimos 12 meses:

21. Você apresentou 3 ou mais crises álgicas? 1. Sim 2. Não |__|
22. Realizou 6 ou mais transfusões? 1. Sim 2. Não |__|
23. Apresentou 1 ou mais úlceras? 1. Sim 2. Não |__|
24. Apresentou 1 ou mais síndrome torácica aguda? 1. Sim 2. Não |__|
25. Sofreu 1 ou mais internações por pneumonia? 1. Sim 2. Não |__|

26. Quais as medicações que está utilizando nessa semana?

1. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____
2. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____
3. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____
4. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____
5. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____

III. Antropometria**OBSERVAÇÕES:**

Parâmetros	___/___/___
1. Peso (Kg)	
2. Estatura (cm)	
3. IMC (Kg/m ²)	

APÊNDICE D – Ficha Clínica da Pesquisa de Participantes sem a Doença Falciforme



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
CENTRO BIOMÉDICO – INSTITUTO DE NUTRIÇÃO
NUTRIFAL/AMB. NUTRIÇÃO EM HEMATOLOGIA (HUPE) – AMB. DE NUTRIÇÃO (HEMORIO)



FICHA CLÍNICA DA PESQUISA – PARTICIPANTES SEM DOENÇA FALCIFORME

INFORM:

I. Identificação do questionário

Nome Completo:
Endereço:
Telefones para contato:
E-mail:
Data de Nascimento __ __ / __ __ / __ __ __ __
Data da Entrada na Pesquisa __ __ / __ __ / __ __ __ __
Idade __ __ e _____ meses
Sexo 1. Masc 2. Fem __
Qual é sua cor/etnia 1. Branca 2. Preta 3. Parda 4. Amarela 5. Indígena __
Horário de Início da entrevista __ __ h __ __ min

II. Entrevista

<p>1. Possui alguma doença? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>2. Você já fez alguma cirurgia? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>4. Você teve algum problema de saúde nas últimas 3 semanas? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>5. Você esteve internado há menos de 2 semanas? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual foi o motivo? _____</p>
<p>6. Você teve algum tipo de infecção nos últimos 2 meses? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual? _____</p>
<p>7. Você fez/faz uso de algum tipo de suplementação de ferro? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual a dosagem? _____</p> <p>Há quanto tempo faz? _____</p> <p>Se já fez e não faz mais, há quanto tempo parou? _____</p> <p>Se já fez e não faz mais, por quanto tempo usou? _____</p>
<p>8. Você fez algum tipo de suplementação vitaminas ou minerais a menos de 2 meses? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual(is)? _____</p> <p>Há quanto tempo? _____</p>
<p>9. Você já teve alguma orientação para restringir algum tipo de alimento? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, qual(is)? _____</p> <p>Quem orientou? _____</p>
<p>10. Nos últimos 6 meses, você teve vontade de comer algo que não fosse um alimento? 1. Sim 2. Não __ </p> <p>Se Sim, o que? _____</p>

<p>11. Já realizou alguma transfusão sanguínea? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>12. Já realizou troca sanguínea? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Quando foi a 1ª vez que você realizou uma transfusão sanguínea? _____</p> <p>Quando foi a 1ª vez que você realizou uma troca sanguínea? _____</p> <p>Ao longo da vida, quantas transfusões você já realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () Mais de 15</p> <p>Ao longo da vida, quantas trocas você já realizou? () De 1 a 4 () De 5 a 9 () De 10 a 15 () Mais de 15</p> <p>Qual foi a última vez que fez transfusão? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____</p> <p>Qual a última vez que fez troca sanguínea? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____</p>
<p>13. Você já realizou alguma doação de sangue? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, é doador regular (3-4 vezes ao ano)? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se é doador regular, há quanto tempo doa sangue? _____</p> <p>Já doou sangue esse ano (doador regular e não regular)? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Quantas vezes? _____</p> <p>Qual a última vez que doou sangue neste ano? _____</p>
<p>14. Você fez/ faz o uso de algum quelante de ferro? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, qual? _____</p> <p>Há quanto tempo? _____</p> <p>Se não faz mais o uso, há quanto tempo parou? _____</p>
<p>15. A que horas que você comeu pela ultima vez? __ _ _ h __ _ _ min</p>
<p>16. Você teve febre ontem? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, Quantos graus? _____</p>
<p>17. Você faz uso <u>regular</u> de bebida alcoólica? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, qual? _____</p> <p>Qual a frequência? () Diariamente () Aos finais de semana () Quinzenalmente () Uma vez/mês</p>
<p>Somente para mulheres</p> <p>18. Qual a idade da menarca? _____ () Ainda não menstruou</p> <p>19. Você ainda menstrua? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, qual o dia do inicio da última menstruação? __ _ _ / __ _ _ / __ _ _ - _____</p> <p>Se Não, qual o mês /ano (<i>ou quantos anos tinha</i>) em que parou de menstruar? __ _ _ / __ _ _ _ _ _ _ </p> <p>Se Não, faz ou fez uso de reposição hormonal?</p> <p>1. Sim, qual o período? _____ 2. Não 3. Não mas já fiz, qual o período? _____ __ _ </p> <p>Se Sim, utiliza (ou) qual tipo de reposição ? _____</p>
<p>Somente para mulheres</p> <p>20. Usa anticoncepcional? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, por quanto tempo? _____</p> <p>Se Sim, qual a marca/nome? _____</p> <p>Se Não, já usou no passado? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, por quanto tempo usou no passado? _____</p> <p>21. Usa DIU? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>Se Sim, de qual tipo? () Hormonal () DIU com cobre</p> <p>Há quanto tempo? _____</p> <p>Se Não, já usou no passado? 1. Sim 2. Não <input type="checkbox"/></p> <p>De qual tipo? () Hormonal () DIU com cobre</p>
<p>22. Quais as medicações que está utilizando nessa semana?</p> <p>1. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____</p> <p>2. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____</p> <p>3. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____</p> <p>4. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____</p> <p>5. _____ Para que? _____ Dosagem _____ Horário: _____</p>

ANEXO A – Ofício da Coordenação Geral de Sangue e Hemoderivados do Ministério da Saúde do Brasil manifestando interesse na realização da pesquisa



**MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA
COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS**

Ofício nº 345/2016/CGSH/DAET/SAS/MS

Brasília, 11 de maio de 2016.

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto

Boulevard 28 de setembro, 77 - Vila Isabel

Cep 20.551-030 - Rio de Janeiro - RJ

cep-hupe@uerj.br

Assunto: Resultado da pesquisa: "Alterações no metabolismo de ferro em pessoas com doença falciforme"

Senhores membros do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto

A Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados, por meio da Área Técnica da Política Nacional de Atenção Integral às Pessoas com Doença Falciforme, instituída no âmbito do SUS pela Portaria GM/MS nº 1391 de 16 de agosto de 2005, demonstra interesse nos resultados da pesquisa intitulada "Alterações no metabolismo de ferro em pessoas com doença falciforme", com registro na Plataforma Brasil e já aprovada por este Comitê, sob o parecer de número 758.174:

Título da Pesquisa: Alterações no metabolismo de ferro em pessoas com doença falciforme	
Pesquisador Responsável: Marta Citelli dos Reis	
Área Temática:	
Versão: 4	
CAAE: 25622113.9.0000.5259	
Submetido em: 08/08/2014	
Instituição Proponente: Instituto de Nutrição	
Situação da Versão do Projeto: Parecer Consubstanciado Emitido (Aprovado)	
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável	
Patrocinador Principal:	FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ Ministério da Saúde

A doença falciforme é pouco estudada, principalmente no que diz respeito aos aspectos nutricionais, não existindo ainda nenhum protocolo de cuidados nutricionais para estes indivíduos. Embora seja uma doença hemolítica, pouco se sabe sobre os aspectos relacionados à



MINISTÉRIO DA SAÚDE
SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ATENÇÃO ESPECIALIZADA E TEMÁTICA
COORDENAÇÃO-GERAL DE SANGUE E HEMODERIVADOS

homeostase de ferro. Os conhecimentos advindos do presente projeto poderão trazer subsídios para reformulação da política nacional de fortificação das farinhas de trigo e milho. Até o presente momento, os únicos indícios de que a fortificação das farinhas de trigo e de milho (mandatória no Brasil) seja segura para as pessoas que tem doença falciforme, provém dos dados preliminares deste estudo conduzido pelo Nutrifal (UERJ/Ministério da Saúde). Os dados preliminares mostraram que as pessoas com doença falciforme que cursam com sobrecarga de ferro são capazes de aumentar a secreção do hormônio hepcidina. Em tese, este hormônio reduz a absorção intestinal de ferro.

Desta forma, embora estas pessoas apresentem excesso de ferro, seus organismos seriam capazes de reduzir a absorção deste nutriente. Entretanto, estes dados são insuficientes para garantirmos que estas pessoas possam consumir as farinhas fortificadas de forma segura. É necessária a realização de testes de absorção de ferro para nos certificarmos de que o consumo não traz perigo a essas pessoas.

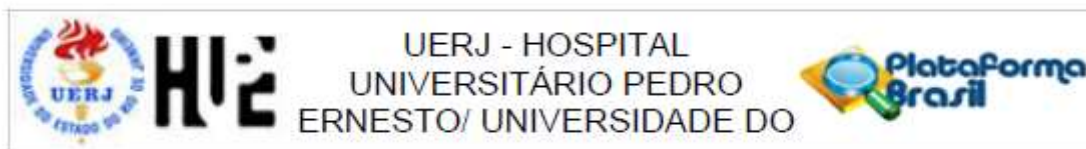
Considerando a invisibilidade da doença e a falta de conhecimento sobre os cuidados nutricionais adequados, estudos como este, que objetivam a melhoria do cuidado ao paciente, são essenciais em nosso entendimento.

Agradecemos pela atenção.

Atenciosamente,

JOÃO PAULO BACCARA
Coordenador-Geral de Sangue e Hemoderivados

ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Sobrecarga de ferro em pessoas com doença falciforme: Avaliação da absorção intestinal de ferro

Pesquisador: marta citelli dos reis

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 25622113.9.0000.5259

Instituição Proponente: Instituto de Nutrição

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.695.418

Apresentação do Projeto:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Objetivo da Pesquisa:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Emenda para aprovação de documentação e alteração de informações relativas ao protocolo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Justificativa da Emenda:

Para aprimorar a avaliação da capacidade de absorção intestinal de ferro foi necessário incluir um novo método, menos invasivo e mais sensível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos enviados a este Comitê estão dentro das boas práticas em pesquisa e apresentando todos dados necessários para apreciação ética.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda apresenta todas as informações necessárias para avaliação ética. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, a Emenda pode ser enquadrada na categoria – APROVADO.

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo

Bairro: Vila Isabel

CEP: 20.551-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2868-8253

E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.695.416

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_113730_0_E2.pdf	18/05/2018 19:14:27		Aceito
Folha de Rosto	folhaderostomaio18.pdf	18/05/2018 19:12:58	marta citelli dos reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclecontrolesadendomaio.pdf	16/05/2018 10:33:09	marta citelli dos reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcledfadendomaio.pdf	16/05/2018 10:32:51	marta citelli dos reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	adendosobrecargamaio.pdf	16/05/2018 10:31:40	marta citelli dos reis	Aceito
Outros	CARTAMINISTERIODASAUDE.pdf	01/09/2016 12:01:54	marta citelli dos reis	Aceito
Outros	declaracao ciencia-falciforme.pdf	01/12/2013 23:28:26		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
 Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
 UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
 Telefone: (21)2868-8253 E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com



Continuação do Parecer: 2.695.418

RIO DE JANEIRO, 06 de Junho de 2018

Assinado por:
DENIZAR VIANNA ARAÚJO
(Coordenador)

Endereço: Avenida 28 de Setembro 77 - Térreo
Bairro: Vila Isabel CEP: 20.551-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 E-mail: cep.hupe.interno@gmail.com

ANEXO C – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (Hemorio)

INSTITUTO ESTADUAL DE
HEMATOLOGIA ARTHUR
SIQUEIRA CAVALCANTI -



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Sobrecarga de ferro em pessoas com doença falciforme: Avaliação da absorção intestinal deste nutriente

Pesquisador: Cláudia dos Santos Cople Rodrigues

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 70074917.2.0000.5267

Instituição Proponente: Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti - HEMORIO

Patrocinador Principal: Ministério da Saúde

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.788.659

Apresentação do Projeto:

Apresentado.

Objetivo da Pesquisa:

Apresentado.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Apresentado.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Apresentado.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresentado.

Recomendações:

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP HEMORIO

Rio de Janeiro, 27 de julho de 2018.

ASSUNTO: Parecer consubstanciado de projeto de pesquisa avaliado pelo CEP HEMORIO

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316

Bairro: Centro

CEP: 20.211-030

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)2332-8611

Fax: (21)2333-3638

E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

INSTITUTO ESTADUAL DE
HEMATOLOGIA ARTHUR
SIQUEIRA CAVALCANTI -



Continuação do Parecer: 2.788.659

Prezada Pesquisadora,

O Comitê de ética desta Instituição, conforme a Resolução CNS 466, de 12 de dezembro de 2012, APROVOU os documentos abaixo relacionados referente ao projeto, "Sobrecarga de ferro em pessoas com Doença Falciforme: Avaliação da absorção intestinal deste nutriente", registrado no CEP HEMORIO sob o número 419/17,

- Emenda protocolo versão 2 - maio/2018;
- Termo de Assentimento e Consentimento Livre e Esclarecido versão 2 – maio/2018.

Atenciosamente,

Marcia Villa Nova
Coordenadora do CEP HEMORIO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda de acordo com as normas do CEP HEMORIO

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_112894_4_E1.pdf	09/05/2018 16:31:54		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto07maio2018.pdf	09/05/2018 15:10:33	marta citelli dos reis	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	ADENDOSOBRECARGAMAIO.pdf	04/05/2018 16:10:45	marta citelli dos reis	Aceito

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316
Bairro: Centro CEP: 20.211-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2332-8611 Fax: (21)2333-3638 E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

INSTITUTO ESTADUAL DE
HEMATOLOGIA ARTHUR
SIQUEIRA CAVALCANTI -



Continuação do Parecer: 2.788.659

Investigador	ADENDOSOBRECARGAMAIO.pdf	04/05/2018 16:10:45	marta citelli dos reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEadendosobrecargamaio.pdf	04/05/2018 16:10:24	marta citelli dos reis	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaosobrecarga.pdf	23/03/2017 10:59:11	marta citelli dos reis	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 27 de Julho de 2018

Assinado por:
MARCIA VILLA NOVA
(Coordenador)

Endereço: Rua Frei Caneca nº 08 SALA316
Bairro: Centro CEP: 20.211-030
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2332-9611 Fax: (21)2333-3638 E-mail: cep@hemorio.rj.gov.br

ANEXO D – Alterações propostas pelos revisores da revista European Journal of Clinical Nutrition

02/12/2020

European Journal of Clinical Nutrition

Email

Manuscript #	2020EJCN1248
Title	Rationale for prescribing diets for iron overload patients
Corresponding Author	Prof. Marta Citelli (Rio de Janeiro State University)
Date:	13th Nov 20 10:04:14
Last Sent:	13th Nov 20 10:04:14
Created By:	Redacted
From:	ejcn@nature.com
To:	martacitelli@gmail.com
BCC:	Redacted
Subject:	Decision for manuscript 2020EJCN1248
Email	<p>Manuscript Number: 2020EJCN1248 Manuscript Title: Rationale for prescribing diets for iron overload patients Authors: Juliana Omena, Cintia Curioni, Claudia Cople-Rodrigues, and Marta Citelli</p> <p>Dear Professor Citelli,</p> <p>Thank you for sending us your manuscript 2020EJCN1248 titled "Rationale for prescribing diets for iron overload patients".</p> <p>Your manuscript has now been reviewed (see comments at the end of this email) and unfortunately based on the comments received, we cannot accept it in its present form. If you are willing to address the comments of the referees in a revised submission we would be happy to reconsider for publication.</p> <p>Revised manuscript submission process Please resubmit your revised manuscript online. Please include the following: A rebuttal letter with a point-by-point response to each of the reviewer comments and with a description of changes made to the manuscript. A marked-up version of the manuscript with the changes highlighted in yellow. Please do not include track changes or comments. Please select the file type Revised Manuscript - Marked Up. A clean version of the manuscript in Word with line numbers. Please select the file type Article File.</p> <p>Your revised manuscript is due on 11th Feb 2021. Please note that your revised manuscript will be sent back to the original referees and we cannot assure you that it will be accepted.</p> <p>Please click on the link below to submit the revision online:</p> <p>Link Not Available ?el=A7BJ2Igz5A4jDI5I7A9ftdIcQiOBoqQqnYU8HSJe0EQZ</p> <p>When resubmitting your manuscript, please note that Springer Nature now requires authors of the <I>European Journal of Clinical Nutrition</I> to include a Checklist that details key elements of the experimental and analytical design of the submission. It is the author's responsibility to complete this checklist, which should be filled out to include all information relevant to your submission. The form must be uploaded with your manuscript and will be made available to the editor and reviewers.</p> <p>European Journal of Clinical Nutrition is committed to improving transparency in authorship. As part of our efforts in this direction, we are now requesting that all authors identified as 'corresponding author' create and link their Open Researcher and Contributor Identifier (ORCID) with their account on the Manuscript Tracking System prior to acceptance. ORCID helps the scientific community achieve unambiguous attribution of all scholarly contributions. You can create and link your ORCID from the home page of the Manuscript Tracking System by clicking on 'Modify my Springer Nature account' and following the instructions in the link</p>

file:///C:/Users/Dell41/Desktop/European Journal of Clinical Nutrition - decision.html

1/3

02/12/2020

European Journal of Clinical Nutrition

below. Please also inform all co-authors that they can add their ORCIDs to their accounts and that they must do so prior to acceptance.

<https://www.springernature.com/gp/researchers/orcid/orcid-for-nature-research>

For more information please visit <http://www.springernature.com/orcid>

If you experience problems in linking your ORCID, please contact the [Platform Support Helpdesk](http://platformsupport.nature.com/).

If you have any queries, please contact the *EJCN* editorial office (ejcn@nature.com).

With best regards,

Manfred Müller & Mario Soares
Co-Editors-in-Chief, *EJCN*
Springer Nature
The Campus
4 Crinan Street
London
N1 9XW
UK

Email: ejcn@nature.com

Reviewer #1 (Comments to the Author):

I have read with great interest the article written by Juliana Omena et al. On their systematic review and meta-analysis, they evaluated the dietary management in patients with iron overload stages.

Overall, the study was carried out properly and the studies included for analysis are appropriate.

I have the following recommendations for the authors:

- Please summarize the introduction which is quite extensive (7-8 paragraphs) into 4-5.
- I would recommend splitting the Results and Discussion sections. This may improve the readability of the manuscript.
- The manuscript may benefit from revision by a native English speaker to improve the reading flow of the article.

Reviewer #2 (Comments to the Author):

Dear authors,

As it is stated in the manuscript, this is a topic that has not been studied thoroughly, hence this review's relevance. However, there are major issues that need to be corrected before a possible publication:

The paper's title gives the idea that the paper will present a review of different suggested diets for this group of patients. But, it analyzes the influence of specific nutrients in IOL patients. So either the title is changed and the rest of the paper is adjusted to that objective, or the authors should add and explain more information on the advantages and disadvantages of specific diets for IOL patients.

Introduction section: Include a figure about the pathophysiological classification of IOL.

I consider that the authors can include a paragraph before the Conclusion section summarizing specifically suggested dosages of the antioxidants analyzed in this review.

02/12/2020

European Journal of Clinical Nutrition

	Include the limitations of this review
--	--