

Elevados níveis de ferro nos doentes alcoólicos: um contributo para esclarecer esta correspondência

Ana Matos¹ · Carla Henriques² · Luís Costa Matos³ · Nuno Monteiro⁴ · Paulo Batista⁵

© The Author(s) 2017

Resumo O mecanismo que estimula o aumento dos níveis de ferro nos pacientes com doença hepática alcoólica (DHA) não está ainda completamente esclarecido, sendo este o cerne deste estudo.

Desde a recente descoberta da hepcidina como proteína com papel crucial na regulação do mecanismo do ferro, várias investigações em animais foram efetuadas, sendo ainda escassos estudos em humanos. Este trabalho envolve um estudo observacional, sobre a expressão da hepcidina em tecido hepático humano em indivíduos com DHA e em indivíduos saudáveis.

Palavras-chave: Doença Hepática Alcoólica, Hepcidina, Regressão Múltipla.

1 Introdução

A doença hepática alcoólica (DHA) define-se como a lesão do fígado causada pela ingestão excessiva de álcool. Em geral, a quantidade de álcool consumido determina a probabilidade e a importância da lesão hepática. Contudo, nem todas as pessoas que bebem excessivamente desenvolvem DHA, ocorrendo também casos de DHA em pessoas que bebem pouco. Apesar do alto consumo de álcool estar

¹Centro de Estudos em Educação Tecnológicas e Saúde, Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu, amatos@estv.ipv.pt

²Centro de Matemática da Universidade de Coimbra (CMUC) e Escola Superior de Tecnologia e Gestão de Viseu, carlahenriq@estv.ipv.pt

³Centro Hospitalar Tondela-Viseu, costamatos.luis@gmail.com

⁴Centro Hospitalar Tondela-Viseu, nunoricardomonteiro@gmail.com

⁵Centro Hospitalar Tondela-Viseu, paulobat@gmail.com

associado à doença hepática alcoólica, não se sabe exatamente como a doença se desenvolve.

Matos (2006), num estudo sobre a epidemiologia da doença hepática alcoólica, refere que a ingestão de bebidas alcoólicas é um hábito enraizado na cultura portuguesa, sendo o álcool a droga de abuso mais frequente em Portugal. Em doentes internados nos EUA, 20 a 40% têm problemas relacionados com o álcool, e, em idosos, o alcoolismo motiva tantos internamentos como o enfarte agudo do miocárdio. No que respeita a Portugal, numa análise retrospectiva efetuada num serviço de Medicina Interna durante 12 anos, verificou-se que, em 7,8% dos internamentos, os diagnósticos principais e/ou secundários são relacionados com o álcool (Matos, 2006).

De facto, o álcool é das drogas mais conhecidas e aceite socialmente e, apesar do elevado número de trabalhos e pesquisas feitos em torno deste problema, muitas questões continuam por esclarecer.

É do conhecimento clínico que os pacientes com doença hepática alcoólica apresentam níveis elevados de ferro no fígado, o que se julga contribuir para o agravamento da doença.

O ferro é um sal mineral essencial para o bom funcionamento do organismo. Desempenha um papel crucial na formação da hemoglobina contida nos glóbulos vermelhos do sangue (responsável pelo transporte de oxigénio para as células e pela eliminação do dióxido de carbono), na formação da mioglobina dos músculos e em numerosas enzimas indispensáveis para o correto funcionamento do organismo.

Um adulto saudável tem de 40 a 160 microgramas de ferro no sangue, que é o nível recomendado. Índices abaixo ou acima dos valores de referência são um sinal de problemas de saúde. A deficiência deste mineral no organismo leva a um quadro conhecido como anemia. O seu excesso pode ser bastante prejudicial à saúde: no fígado, altos níveis do mineral podem causar cirrose; no pâncreas, diabetes; no coração, insuficiência cardíaca; nas glândulas, mau funcionamento e problemas na produção hormonal.

A acumulação de ferro em quantidades superiores às necessárias pode ter causas genéticas - por exemplo o caso dos portadores de hemocromatose, ou podem ser adquiridas - caso dos doentes alcoólicos.

O organismo humano não tem nenhum mecanismo de rejeição do ferro (à exceção das mulheres em idade fértil através da menstruação). Recentemente foi descoberta uma proteína produzida no fígado, denominada hepcidina (Krause *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001), que impede a absorção intestinal do ferro, regulando a quantidade de ferro que entra no organismo.

Existem vários fatores que podem influenciar a expressão da hepcidina. A anemia, a carência de ferro e a perda da função hepática na cirrose, entre outros, diminuem a expressão da hepcidina, enquanto que a inflamação e a sobrecarga de ferro aumentam-na. Em 2007 (Takaaki *et al.*, 2007) foi provado, em experimentação animal com ratos, que o álcool exerce influência nos níveis de hepcidina, diminuindo a expressão desta proteína.

O agravamento da DHA julga-se estar relacionado com os elevados níveis de ferro no fígado destes pacientes. Investigar sobre o que origina tal cenário é de crucial importância para tentar controlar a evolução da DHA. De facto, é conhecida a relação entre os níveis elevados de ferro e a doença alcoólica do fígado, no entanto o que provoca este aumento dos níveis de ferro é um mecanismo desconhecido. É nesta questão que se centra a investigação apresentada neste trabalho, pretendendo-se contribuir para clarificar este mecanismo nos pacientes com DHA.

O estudo observacional envolveu pacientes selecionados na consulta ambulatória de doenças Hepáticas do Centro Hospitalar Tondela-Viseu.

Recorreu-se a análises estatísticas univariadas e multivariadas de modo a identificar os fatores associados com os níveis de hepcidina. A comparação dos controlos com os pacientes de DHA foi feita através de testes paramétricos, sempre que as condições de aplicabilidade dos mesmos eram satisfeitas, e testes não paramétricos, caso contrário. Foram utilizados os testes de Mann-Whitney, teste t, teste de Kruskal-Wallis e testes de comparações múltiplas. A análise conjunta dos fatores relacionados com a hepcidina foi levada a cabo através da estimação de modelos de regressão linear múltipla. Toda a análise estatística foi efetuada com suporte no *software* estatístico SPSS - versão 22.

2 Métodos e resultados

O estudo envolveu 61 pacientes com DHA e 20 controlos saudáveis. Os pacientes foram selecionados da consulta ambulatória de doenças Hepáticas do Centro Hospitalar Tondela-Viseu. As amostras de fígado normal (controlos) foram recolhidas em pacientes admitidos para colecistectomia eletiva. Durante o procedimento cirúrgico, uma pequena amostra de fígado foi recolhido. A avaliação da biópsia do fígado foi realizada no Departamento de Anatomopatologia do Hospital da Universidade de Coimbra.

Na Tabela 1 comparam-se os pacientes com DHA e os controlos relativamente às variáveis em análise neste estudo. A ferritina é usada para quantificar os níveis de ferro. Trata-se de uma proteína globular que se localiza essencialmente no fígado.

A fibrose é o resultado da manutenção por longo período da inflamação do fígado, que vai formando fibras (cicatrices), as quais, por sua vez, passam a dificultar a passagem do sangue pelas veias do órgão. A manutenção da fibrose por um longo período leva ao estado de cirrose. A fibrose classifica-se em 5 níveis: 0 - ausência de fibrose; 1 - Fibrose periportal ou perissinusoidal; 2 Fibrose periportal e perissinusoidal; 3 - Fibrose em ponte; 4 - Cirrose.

Tabela 1 - Apresentação sumária da amostra.

	Pacientes com DHA (n=61)		Controlos (n=20)		p ^(*)
Ferritina	434,7±387,9		115,7±81,8		<0,0005
Hepcidina	1,56±2,4		8,32±18,0		=0,002
Grau fibrose	0	1	2	3	0
%	18	8,2	11,5	21,3	100%

Nas variáveis contínuas são apresentados valores médios ± desvio padrão
(*) Teste de Mann-Whitney

A comparação dos dois grupos em estudo permite constatar que os pacientes com doença hepática alcoólica apresentam níveis de ferritina significativamente superiores aos controlos ($p < 0,0005$) e níveis de hepcidina inferiores ($p = 0,002$). Quer na hepcidina quer na ferritina, observam-se elevados desvios em relação à média, causados pela presença de observações atipicamente elevadas. Sendo estes registos reais e clinicamente admissíveis, a sua remoção do conjunto de dados em análise estava fora de questão. Para contornar esta dificuldade, as análises estatísticas foram efetuadas com as variáveis transformadas: logaritmo da hepcidina ($\log_hepcidina$) e inverso da ferritina ($Inv_ferritina$).

Começou-se por avaliar a relação entre os níveis de hepcidina e ferritina recorrendo a modelos de regressão linear simples. As Figuras 1 e 2 ilustram o efeito da transformação das variáveis na identificação das associações:

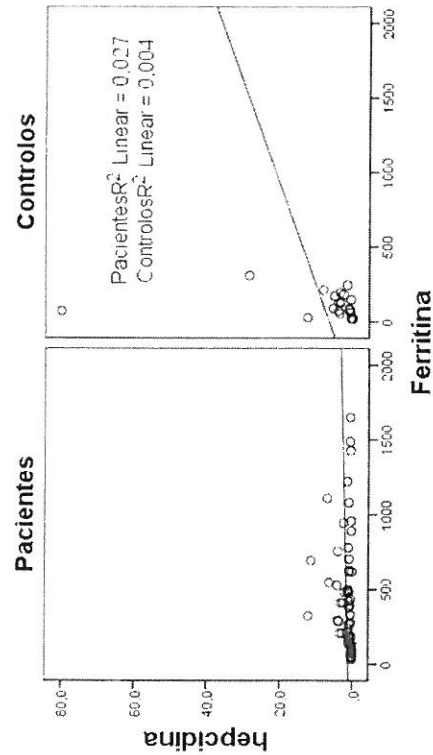


Figura 1 - Relação linear entre hepcidina e ferritina.

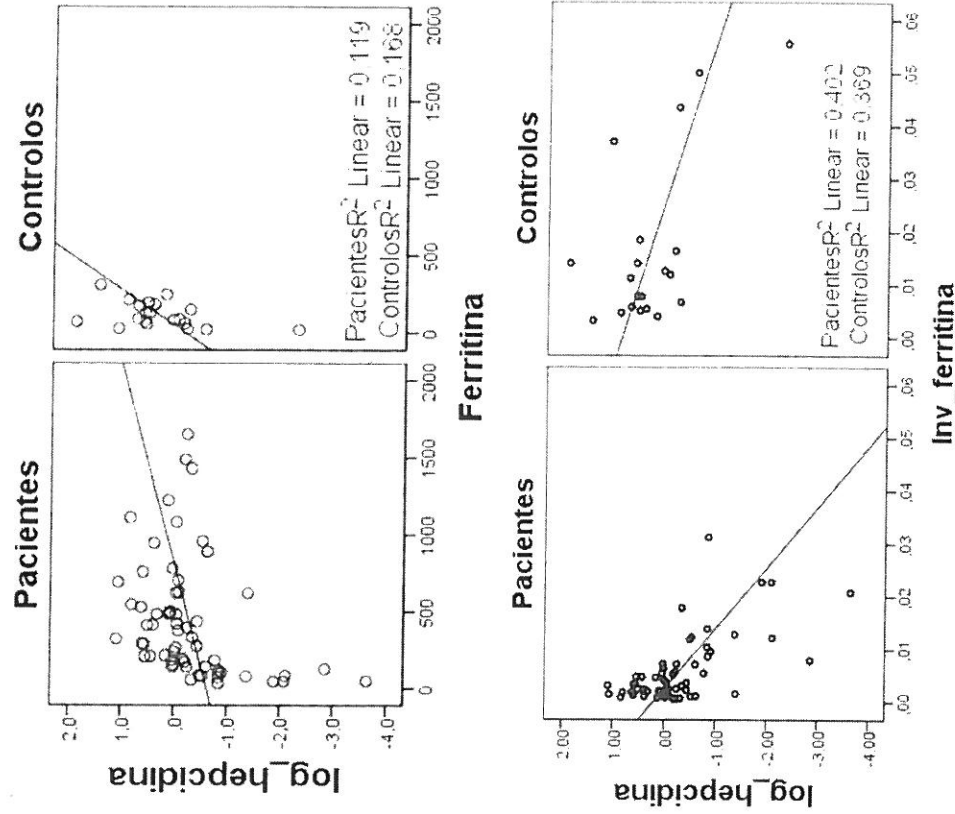


Figura 2 - Relação linear entre transformações da hepcidina e ferritina.

Os modelos confirmam a relação conhecida entre a hepcidina e os níveis de ferro (ferritina), sustentando a hipótese de que um dos fatores que incentiva a produção desta proteína é o excesso de ferro.

Também a perda da função hepática, resultante do aumento dos níveis de fibrose se revelou associada a uma menor expressão da hepcidina, conforme Figura 3 e teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,003$). Observaram-se diferenças estatisticamente significativas entre o grupo de controlo e os dois níveis mais graves de fibrose.

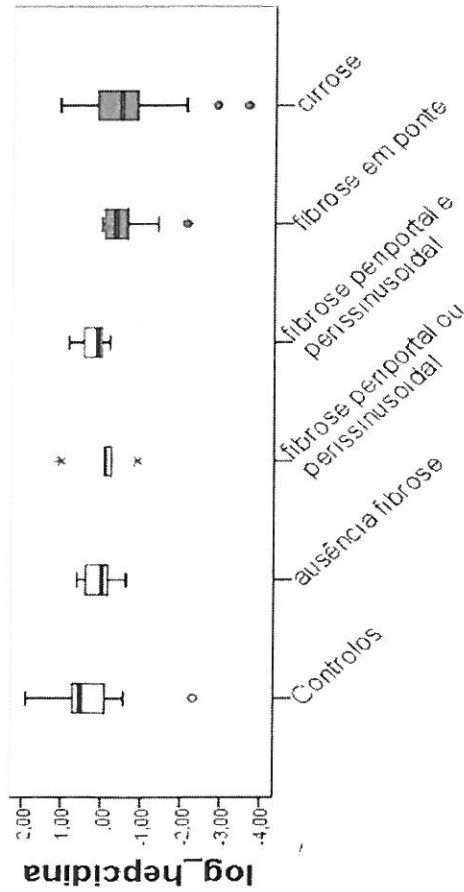


Figura 3 - Relação entre hepática e os níveis de fibrose.

Num esforço para analisar conjuntamente as variáveis em estudo e o seu efeito sobre os níveis de hepática, recorreu-se à regressão linear múltipla.

Tabela 2 - Modelo de regressão linear múltipla.

Modelo	Coeficientes		T	(p)	Intervalo de confiança	Colinearidade	
	B	Erro padrão				Tolerância	VIF
Constante	1,125	0,213	5,291 (<0,00005)	0,701	1,548		
Fibr.graus 3e4	-0,409	0,191	-2,138 (0,036)	-0,790	-0,028	0,550	1,818
Tipo	-0,890	0,247	-3,609 (0,001)	-1,381	-0,399	0,768	1,302
Inv._ferritina	-46,72	8,425	-5,545 (<0,0005)	-63,5	-29,945	0,681	1,468

O modelo estimado da Tabela 2 traduz-se na forma:

$$\log \hat{y} = 1,125 - 0,409 x_1 - 0,89 x_2 - 46,72 x_3,$$

onde, y representa a hepática e x_1 , x_2 e x_3 representam as variáveis independentes, respetivamente, Fibr_graus 3 e 4, Tipo e Inv_ferritina. O valor estimado da hepática pode, então, ser obtido através de:

$$\hat{y} = 13,33 \times 10^{-0,409x_1} \times 10^{-0,89x_2} \times 10^{-46,72x_3}.$$

O modelo estimado reafirma a relação entre a hepática e a ferritina (aumento significativo dos níveis de hepática com aumento da ferritina) e a diminuição da hepática nos dois níveis graves de fibrose hepática (variável Fibr. graus 3 e 4: 1 - paciente com fibrose em ponte ou cirrose; 0-paciente não apresenta fibrose em ponte nem cirrose). Estima-se que, em indivíduos com características semelhantes nas variáveis Tipo e Inv_ferritina, pelo facto de apresentarem grau de fibrose 3 ou 4, têm significativamente menos 61% ($(1-10^{-0,409}) \times 100\%$) de hepática.

O aumento dos níveis de hepática com aumento da ferritina não é de interpretação tão imediata. No entanto, observe-se que a passagem dos níveis de ferritina de 500 para 600 conduz a uma subida na hepática de 0,8064 para 0,8359, correspondendo a um aumento da hepática de 3,6%; já a passagem dos níveis de ferritina de 600 para 700, provoca uma subida na hepática de 0,8359 para 0,8575, correspondendo a um aumento de 2,6%. De facto, o aumento percentual na hepática devido a um acréscimo de 100 unidades de ferritina, mantendo as outras variáveis constantes, é estimado em:

$$c_1 \frac{100}{f^2 + 100f} - 1,$$

onde $c_1 = 10^{-46,72}$ e f é o valor base de ferritina. Em resumo, a subida nos valores de ferritina conduz, em média, a um aumento no valor de hepática, embora esse aumento dependa do valor base de ferritina.

O modelo permite, pois, não só confirmar os fatores conhecidos de influência na expressão da hepática (níveis de ferro e grau de fibrose) como também acrescentar que a DHA exerce um papel crucial nos níveis de hepática (variável tipo: 1-paciente com DHA; 0-controlo saudável). Indivíduos com características semelhantes, pelo facto de desenvolverem DHA, têm significativamente menos hepática e este decréscimo estima-se em 87,2% ($(1-0,128) \times 100\%$). Fica, assim, facultada uma evidência de que os doentes de DHA têm, para os mesmos níveis de ferro, menores níveis de hepática, podendo esta relação ajudar a esclarecer os elevados níveis de ferro nos pacientes de DHA.

Cerca de 41% da variabilidade da hepática ($R^2=0,411$) é explicada pela variabilidade da ferritina, pela presença/ausência de níveis graves de fibrose hepática e pela presença/ausência de DHA. O valor do coeficiente de determinação, inferior a 0,5, sugere que existem outras variáveis explicativas, não consideradas neste estudo, que influenciam a expressão da hepática. Em desenvolvimentos futuros deste trabalho deverá ter-se em conta esta questão.

Os pressupostos do modelo de regressão anterior foram avaliados através da análise dos resíduos. O teste de Durbin-Watson foi utilizado para avaliar o pressuposto de independência, não se tendo rejeitado a hipótese de independência entre resíduos sucessivos (estatística de Durbin-Watson=1,95). Recorrendo ao teste de Kolmogorov-Smirnov, com correção de Lilliefors, não obtivemos evidência de que o pressuposto de normalidade fosse violado ($p>0,2$). Pela análise do gráfico residual (Figura 4) não há indicação de violação do pressuposto de homocedasticidade.

Utilizamos a tolerância e o fator de inflação da variância (do anglo-saxónico *Variance Inflation Factor - VIF*), para quantificar o quanto cada uma das variáveis independentes está associada às outras. A tolerância da variável X_i mede a proporção da sua variação que não é explicada pelas restantes variáveis independentes. Definim-se tolerância $_i=1-R_i^2$ e $VIF_i=1/(1-R_i^2)$, onde R_i^2 é o coeficiente de determinação do modelo entre a variável X_i (variável dependente) e todas as outras variáveis independentes. Observa-se que, para qualquer uma das variáveis, a tolerância é superior a 0,55 e os valores de VIF são inferiores a 5

(Montgomery & Peck, 1982), refletindo ausência de forte associação entre as variáveis independentes do modelo, sendo este um indicador de não existência de problemas de multicolinearidade (Tabela 2).

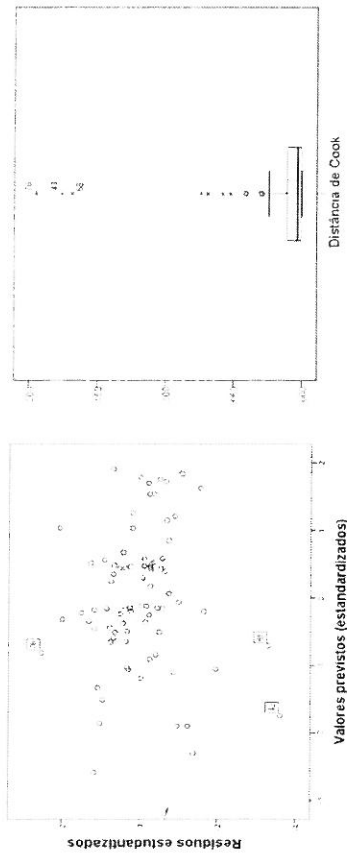


Figura 3 – Gráfico residual (à esquerda); caixa de bigodes da distância de Cook (à direita).

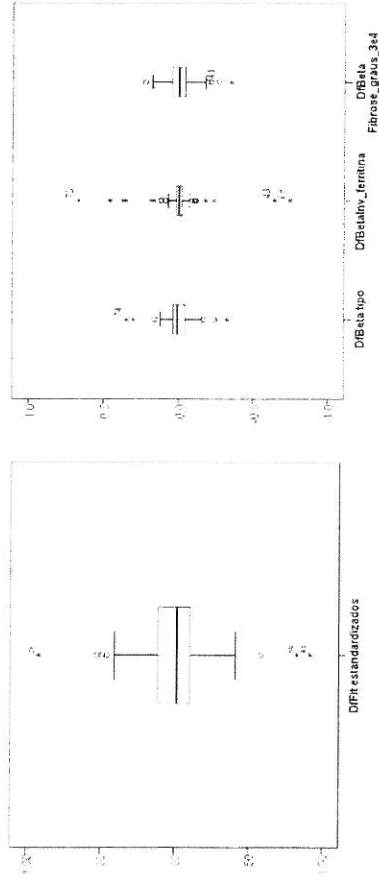


Figura 4 – Caixa de bigodes dos DFFITS e DFBETAS.

Não parece, pois, haver problemas com a não satisfação dos pressupostos do modelo de regressão linear. Contudo, através da análise dos gráficos da Figura 4 – gráfico residual e a caixa de bigodes (onde se representa a distribuição dos valores da distância de Cook) – detetamos a presença de algumas observações com valores extremos, que poderão exercer influência na estimação do modelo. Os valores dos DFFITS e DFBETAS (Freund *et al.*, 2006) confirmam que as observações com números 43, 68 e 76 são potencialmente influentes na estimação dos coeficientes do modelo (Figura 5). Estimando o modelo de regressão sem cada uma destas observações (Tabela 3: modelo 43, modelo 68 e modelo 76, respetivamente), não se notam grandes alterações nos parâmetros estimados, mantendo-se todas as conclusões tiradas do modelo original (Tabela 3: Modelo 0).

Tabela 3 - Modelos de regressão linear múltipla.

Modelo	Modelo 0		Modelo 43		Modelo 68		Modelo 76	
	B	Erro padrão	B	Erro padrão	B	Erro padrão	B	Erro padrão
Constante	1,125	0,213	1,042	0,196	1,080	0,216	1,112	0,205
Fibr_graus 3 e 4	-0,409	0,191	-0,363	0,176	-0,443	0,193	-0,402	0,186
Tipo	-0,890	0,247	-0,821	0,227	-0,862	0,248	-0,863	0,238
Inv_ferritina	-46,72	8,425	-41,77	7,833	-40,66	9,576	-51,60	8,419

A avaliação da estabilidade do modelo foi levada a cabo através do *Bootstrap*, cujos resultados são apresentados na Tabela 4. Os valores dos erros padrão e dos intervalos de confiança estimados por *Bootstrap* são muito semelhantes aos apresentados na Tabela 2.

Tabela 4 - Análise *Bootstrap*.

Modelo	B	Viés	<i>Bootstrap</i> ^a		
			Erro padrão	p	Intervalo de Confiança 95%
1 Constante	1,125	0,014	0,204	,001	0,770 1,558
Fibr_graus_3e4	-0,409	0,001	0,158	,014	-0,723 -0,110
Tipo	-0,89	-0,011	0,205	,001	-1,351 -0,540
Inv_ferritina	-46,72	-1,125	12,195	,002	-73,682 -26,097

a. resultados baseados em 1000 amostras *bootstrap*

3 Conclusões

Este estudo sugere que a sobrecarga de ferro no organismo dos doentes alcoólicos do fígado está associada a uma expressão da hepcidina muito diminuída, o que permite uma maior absorção de ferro no intestino. De facto os pacientes com DHA apresentam níveis significativamente mais baixos de hepcidina o que vai permitir uma absorção excessiva do ferro. Estes resultados encorajam a continuação de estudos, no sentido de extrapolar para o ser humano a conclusão já verificada em animais pelas investigações de Takaaki *et al.*, 2007 e de Harrison *et al.*, 2007, evidenciando que DHA só por si influencia os níveis de hepcidina, o que leva a um aumento de ferro nestes pacientes.

Referências

- FREUND, R. J., WILSON, W. J. & SA, P. (2006). *Regression Analysis, Statistical Modeling of a response variable*, 2nd edition, Academic Press.
- HARRISON, D., DUYGU, F., CRIST, C., KLEIN, E., EVANS, J., TIMCHENKO, N. & GOLLAN, J. (2007). Iron Mediated Regulation of Liver Hepcidin Expression in Rats and Mice is Abolished by Alcohol. *Hepatology*, 46 (6), 1979-1985.
- MATOS, L.C. (2006). Doença Hepática Alcoólica (DHA), *Medicina Interna*, 13, (3), 207-216.
- MONTGOMERY, D. C. & PECK, E. C. (1982). *Introduction to Linear Regression Analysis*, New York, John Wiley & Sons.
- KRAUSE, A., NEITZ, S., MÄGERT, H., SCHULZ, A., FORSSMANN, W., SCHULZ-KNAPPE, P. & ADERMAN, K. (2000). LEAP-1, A Novel Highly Disulfide-bonded Human Peptide, Exhibits Antimicrobial Activity, *FEBS Letters*, Sep 1; 480 (2-3), 147-150.
- PARK, C., VALORE, E., WARING, A. & GANZ, T. (2001). Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver, *Journal of Biological Chemistry*, Mar 16, 276 (11), 7806-7810.
- TAKAOKI, O., HIROYUKI, S., YAYOI, H., MITSUTAKA, I., SHIGEKI, M., YASUAKI, S., YOSHINORI, F. & YUTAKA, K. (2007). Hepcidin Is Down-Regulated in Alcohol Loading, *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, Jan (31), No. S1.