

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
Doutorado em Saúde Pública

CRISTIANE CAMPELLO BRESANI

**A UTILIDADE DOS ÍNDICES ERITROCITÁRIOS E DA FERRITINA SÉRICA NA
INDICAÇÃO DE FERROTERAPIA E NA PREDIÇÃO DA EFICÁCIA
TERAPÊUTICA DO FERRO ORAL DURANTE A GRAVIDEZ:
A INADEQUAÇÃO DO CONCEITO GAUSSIANO DA NORMALIDADE PARA O
MANEJO DOS CASOS DE ANEMIA FERROPRIVA MATERNA**

Recife

2013

Cristiane Campello Bresani

A utilidade dos índices eritrocitários e da ferritina sérica na indicação de ferroterapia e na
predição da eficácia terapêutica do ferro oral durante a gravidez:
a inadequação do conceito Gaussiano da normalidade para o manejo dos casos de anemia
ferropriva materna

Tese apresentada ao Curso de Doutorado
em Saúde Pública do Centro de
Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação
Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau
de doutor em ciências.

Orientadores

Dra. Maria Cynthia Braga

Dr. Malaquias Batista Filho

Recife

2013

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

B842u Bresani, Cristiane Campello.
A utilidade dos índices eritrocitários e da ferritina sérica na indicação de ferroterapia e na predição da eficácia terapêutica do ferro oral durante a gravidez: a inadequação do conceito Gaussiano da normalidade para o manejo dos casos de anemia ferropriva materna / Cristiane Campello Bresani. - Recife: [s.n.], 2013.
112 p. : ilus., graf., tab.

Tese (doutorado em saúde pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

Orientadores: Maria Cynthia Braga, Malaquias Batista Filho.

1. Anemia Ferropriva - diagnóstico. 2. Gravidez. 3. Sensibilidade e Especificidade. 4. Sulfato Ferroso. I. Braga, Maria Cynthia. II. Batista Filho, Malaquias. III. Título.

CDU 616.155.194

CRISTIANE CAMPELLO BRESANI

A utilidade dos índices eritrocitários e da ferritina sérica na indicação de ferroterapia e na predição da eficácia terapêutica do ferro oral durante a gravidez:
a inadequação do conceito Gaussiano da normalidade para o manejo dos casos de anemia ferropriva materna

Tese apresentada ao Curso de Doutorado em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, para a obtenção do grau de doutor em ciências.

Aprovada em 20/05/2013

BANCA EXAMINADORA

Dra. Maria Cynthia Braga

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –
Fiocruz

Dr. Malaquias Batista Filho

Instituto de Medicina Integral Prof
Fernando Figueira

Dra. Maria de Fátima Militão

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –
Fiocruz

Dra. Leila Katz

Instituto de Medicina Integral Prof
Fernando Figueira

Dra. Ana Lúcia Vasconcelos

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães –
Fiocruz

Dr. Pedro Israel Cabral de Lira

Universidade Federal de Pernambuco

Zoom
(Julio Bresani)

Das janelas
do pensamento
o verdadeiro conteúdo,
abençoando a vida
com outros olhos, menos reticentes
mais sonhadores.
Como sempre
livres sobretudo

Devo esta tese a Dr. Malaquias Batista Filho, meu eterno mentor e maior entusiasta.

AGRADECIMENTOS

Agradecer à minha família não é o bastante para retribuir à compreensão e ao companheirismo dedicados a mim por tantos anos. Federico, Frederico e Blanca merecem, não apenas um simples agradecimento, mas que eu continue buscando o ideal de esposa e de mãe. Espero que os meus pais entendam esta tese como a consolidação de todo o seu empenho para minha formação como pessoa e como profissional.

Agradeço sinceramente a cada gestante que participou do estudo e aos profissionais que contribuíram direta e indiretamente com a pesquisa: a Debora Bresani Salvi, por sua dedicação e competência na coordenação do trabalho de campo; a Adriana Afonso Ferreira (enfermeira do pré-natal do IMIP), pelo auxílio no recrutamento das gestantes; a Mércia Cristina Batista Veras (chefe da Farmácia do IMIP), por seu empenho na guarda e fornecimento da medicação; a Maria do Rosário Soares de Almeida Lelis de Moura, Jacqueline Barros Palmerston, Waldylene Barbosa Calabria e a Flávia Angélica Santos de Araújo, pelo fundamental apoio no setor do laboratório de análises clínicas do IMIP; e a Dra. Ana Laura Ferreira Gomes (chefe do ambulatório de saúde da mulher do IMIP), pelo acolhimento da equipe de pesquisa no serviço de pré-natal.

Agradeço especialmente ao Sr. Mauro Hauschild (presidente do Instituto Nacional do Seguro Social) por ter reconhecido a importância do doutoramento em Saúde Pública para a atividade médico-pericial ao permitir meu afastamento da função no período entre o estudo de campo e a conclusão da tese; a Dr. José Natal Figueirôa (docente da Pós-graduação em Saúde Materno-infantil do IMIP), por seu suporte metodológico, essencial na concepção do protocolo da pesquisa e nas análises dos dados; e a Dr. Breno Sampaio (docente da Pós-graduação de Economia da UFPE), pela ajuda amiga nas análises adicionais dos dados.

À Dra. Maria de Fátima Militão (docente do curso de Doutorado em Saúde Pública do CPqAM-Fiocruz) gostaria de agradecer imensamente por sua contribuição durante a revisão final e a defesa desta tese, o que me fez recuperar a autoconfiança no senso crítico e criativo que me caracterizam como indivíduo, mas que, ao longo desses últimos anos, foi sufocado pelas limitações e barreiras próprias das instituições burocrático-científicas e de seus atores envolvidos neste processo de doutoramento.

A concretização deste trabalho homenageia a memória de Dr. George Hector Beaton (líder do grupo de pesquisas em Nutrição da Universidade de Toronto-Canadá), por ter deixado como legado à comunidade científica o detalhamento da metodologia dos escores Z de hemoglobina em gestantes, sem o qual a tese não seria factível.

BRESANI, Cristiane Campello. A utilidade dos índices eritrocitários e da ferritina sérica na indicação de ferroterapia e na predição da eficácia terapêutica do ferro oral durante a gravidez: a inadequação do conceito Gaussiano da normalidade para o manejo dos casos de anemia ferropriva materna. 2013. Tese (Doutorado em Saúde Pública) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

RESUMO

Objetivo: estimar a acurácia dos índices eritrocitários (eritrometria, concentração de hemoglobina-Hb, hematócrito-HTC, volume corpuscular médio-VCM, hemoglobina corpuscular média-HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média-CHCM, *red blood cell distribution width-RDW*, contagem de reticulócitos) e da ferritina sérica (FS) para o diagnóstico de deficiência de ferro em gestantes. **Métodos:** a tese compreendeu três estudos. O primeiro, com dados de linha de base de 347 gestantes não suplementadas com ferro de um ensaio clínico ocorrido entre maio de 2000 e junho de 2001, calculou curvas de distribuição e a acurácia dos índices eritrocitários *versus* o padrão-ouro FS < 12 ng/mL. O segundo analisou os dados longitudinais das 140 mulheres arroladas para tratamentos com 60 mg de ferro oral (semanal, duas vezes por semana ou diário), desse ensaio clínico precedente; sendo cada grupo de tratamento subdividido em estratos com ou sem deficiência de ferro (FS < 12 ng/mL) para se compararem as respostas terapêuticas (médias das diferenças-MD entre Hb pós e pré-tratamento) aferidas em valores absolutos (g/dL) e em escores Z (desvio padrão-DP). O ensaio clínico original da tese ocorreu entre agosto de 2011 e dezembro de 2012, teve desenho de validação fase III com 144 gestantes anêmicas (Hb < 11 g/dL) tratadas com 80 mg de ferro diários por 28 a 90 dias, e determinou parâmetros de acurácia dos índices eritrocitários e da FS pré-tratamento *versus* o padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral*, aferida através da diferença entre escores Z de Hb antes-e-depois da intervenção. **Resultados:** os valores médios de eritrometria ($3,7 \cdot 10^{12}$ células/L), HTC (32,9%) e Hb (10,8 g/dL) situaram-se abaixo dos pontos de corte recomendados. As curvas dos índices morfológicos não se ajustaram à distribuição Normal, tendo as seguintes médias: VCM=88,4 fL; HCM=29,0 pg e CHCM=32,8 g/dL. Hb apresentou sensibilidade (Se) de 60,7% (IC95% 46,8-73,5), especificidade (Es) de 44,3% (IC95% 38,2-50,5) e área sob a curva ROC (ASC) de 0,54 (IC95% 0,46-0,63) com relação à FS < 12 ng/mL. No ensaio clínico prévio, a análise não estratificada revelou que, nos grupos em tratamentos intermitentes, os incrementos na Hb não se reproduziram quando ajustados pelos escores Z. Ao estratificar cada grupo, apenas mulheres tratadas com doses diárias de ferro ou mulheres com FS \geq 12 ng/mL tratadas com pelo menos duas doses semanais alcançaram efeitos positivos nos valores absolutos de Hb e mantiveram os seus escores Z. Mulheres com deficiência de ferro tratadas com esquemas intermitentes tiveram redução, tanto nos valores absolutos de Hb, como nos seus escores Z: semanal = -0,42 g/dL (IC95% -0,72;-0,12) e -1,4 DP (IC95% -1,74;-0,99); duas vezes por semana = -0,14 g/dL (IC95% -0,46;0,17) e -1,1 DP (IC95% -1,44;-0,75). Utilizando-se a *resposta a teste terapêutico com ferro oral* como padrão-ouro, os valores iniciais de Hb e HTC apresentaram Se e Es em torno de 50%; enquanto a FS e os índices morfológicos (VCM, HCM, CHCM, *RDW*) apresentaram Se em torno ou abaixo de 30% com Es acima de 70%. As ASC variaram de 0,51 (eritrometria, VCM e *RDW*) a 0,64 (CHCM) e as razões de verossimilhança positivas e negativas situaram-se em torno de 1,0. **Conclusões:** os índices eritrocitários possuem baixa acurácia na detecção de baixos estoques corporais de ferro na gravidez, e, assim como a FS, são pouco informativos para detectar, predizer e discriminar a avidez pelo ferro em gestantes anêmicas. O teste terapêutico com ferro oral, avaliado em escores Z de Hb, constitui-se em ferramenta útil para o manejo da anemia materna.

Palavras-chave: Anemia Ferropriva, Diagnóstico. Gravidez. Sensibilidade. Especificidade. Efeitos Adversos. Sulfato Ferroso. Cooperação do paciente.

BRESANI, Cristiane Campello. The utility of erythrocyte indices and serum ferritin to prescribe iron-therapy and to predict the therapeutic efficacy of oral iron during pregnancy: the inappropriateness of the normal Gaussian-concept to manage maternal iron-deficiency anaemia cases. 2013. Thesis (Doctorate in Public Health) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.

ABSTRACT

Objective: to estimate the accuracy of the erythrocyte indices (red blood cell count, haemoglobin concentration-Hb, haematocrit-HTC, mean corpuscular volume-MCV, mean corpuscular haemoglobin-MCH, mean corpuscular haemoglobin concentration-MCHC, red blood cell distribution width-RDW, reticulocyte count) and the serum ferritin (SF) for iron deficiency diagnosis in pregnant women. **Methods:** the thesis comprised three studies. The first study evaluated the baseline data from 347 pregnant women before the iron supplementation of a clinical trial performed between May 2000 and June 2001, and determined the distribution curves of the erythrocyte indices and their accuracy parameters *versus* SF < 12 ng/mL. The second study examined longitudinal data from the 140 women enrolled for the preceding trial to receive 60 mg of oral iron (weekly, twice a week or daily) and each treatment group was subdivided into strata with and without iron deficiency (SF < 12 ng/mL) to compare the therapeutic responses (means of differences-MD between pre and post-treatment Hb) in absolute values (g/dL) and in Z-scores (standard deviation-SD). The original trial of this thesis was carried out between August 2011 and October 2012 and had a phase III validation design with 144 anemic pregnant women (Hb < 11 g/dL) treated with 80 mg of elemental iron daily during 28 to 90 days, to calculate the accuracy parameters of erythrocyte indices and SF pre-treatment *versus* the gold-standard *responsiveness to therapeutic test with oral iron*, which was measured by the differences between the Hb Z-scores before-and-after the trial. **Results:** the mean value of red blood cell count (3.7×10^{12} cells/L), HTC (32.9%) and Hb (10.8 g/dL) were below their reference cutoff points. The curves of morphological indices were not adjusted to the Normal distribution with the following mean values: MCV=88.4 fL; MCH=29.0 pg and MCHC=32.8 g/dL. Hb showed a sensitivity (Se) of 60.7% (95%CI 46.8-73.5), specificity (Sp) of 44.3% (95%CI 38.2-50.5) and area under the ROC curve (AUC) of 0.54 (95%CI 0.46-0.63) according to the SF. In the prior clinical trial, the non-stratified analysis revealed that in the intermittent treatments, the Hb increments were not reproduced when the values were adjusted with the Z-scores. By stratifying each group, only the treated women with daily doses of iron or women with SF \geq 12 ng/ml and treated with at least two weekly doses of iron have achieved positive effects in the absolute values of Hb and maintained their Z-scores. Women with iron deficiency and treated with intermittent regimens have a reduction, either in the absolute values of Hb, or in their Z-scores: weekly = -0.42 g/dL (95%CI -0.72;-0.12) and -1.4 SD (95%CI-1.74;-0.99); twice a week = -0.14 g/dL (95%CI -0.46;0.17) and -1.1 SD (95%CI -1.44;-0.75). Applying the *responsiveness to therapeutic test with oral iron* as the gold-standard, Hb and HTC showed Se and Sp at about 50%; while SF and the morphological indices (MCV, MCH, MCHC, RDW) demonstrated Se at about or below 30% with Sp above 70%. The AUC varied from 0.51 (red blood cell count, MCV and RDW) to 0.64 (MCHC) and the ratio positive:negative likelihood ratios are about 1.0. **Conclusions:** the erythrocyte indices have low accuracy in detecting low body iron reserves in pregnancy, as well as, they and the SF were less informative regarding the detection, prediction and discrimination of anemic pregnant women with iron need. The therapeutic test with oral iron, evaluated by Hb Z-scores, constitutes a useful tool in the management of maternal anemia cases.

Keywords: Anemia, Iron-Deficiency, Diagnosis. Pregnancy. Sensitivity. Specificity. Ferrous Sulfate. Adverse Effects. Patient Compliance.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
1.1 A definição de anemia: o paradigma Gaussiano da normalidade e o diagnóstico da anemia materna	14
1.2 A hemodiluição fisiológica da gravidez e suas implicações na avaliação laboratorial da anemia: do diagnóstico à mensuração da resposta à ferroterapia	17
1.3 O diagnóstico da deficiência de ferro materna: a multicausalidade das anemias e a inacurácia dos biomarcadores de ferro corporal durante a gravidez	19
1.4 Os três estudos da tese: pressupostos, problemas, <i>rationale</i> e hipóteses	22
2 OBJETIVOS	25
2.1 Estudo 1 - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?	25
2.2 Estudo 2 - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina	25
2.3 Estudo 3 - Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica no diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez	26
3 MÉTODOS	27
3.1 Estudo 1 - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?	28

3.2 Estudo 2 - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina	28
3.3 Estudo 3 - Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica no diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez	29
4 RESULTADOS	32
4.1 Artigo I - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?	33
4.2 Artigo II - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina	39
4.3 Artigo III - Protocolo de estudo – Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica para o diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez	54
4.4 Artigo IV - Artigo original – Acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica no diagnóstico da anemia ferropriva materna (AMA): um estudo sobre a predição da resposta terapêutica à ferroterapia oral	63
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	89
6 CONCLUSÕES	93
7 RECOMENDAÇÕES	95

REFERÊNCIAS	97
APÊNDICE A – ALGORITMO DOS PROCEDIMENTOS DE ATENDIMENTO ÀS GESTANTES NO ESTUDO AMA	103
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	104
APÊNDICE C – INSTRUMENTOS PARA ENTREVISTA E COLETA DOS DADOS DO ESTUDO AMA	105
APÊNDICE D – NOMOGRAMA PARA O CÔMPUTO GRÁFICO DO ESCORE Z DE HB DE GESTANTES EM CADA SEMANA DE GESTAÇÃO	111
ANEXO A - MÉDIAS DE REFERÊNCIA DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE HEMOGLOBINA (HB) DE ACORDO COM A SEMANA DE GESTAÇÃO UTILIZADAS PARA CÁLCULO DO ESCORE Z DA HB	112

1 INTRODUÇÃO

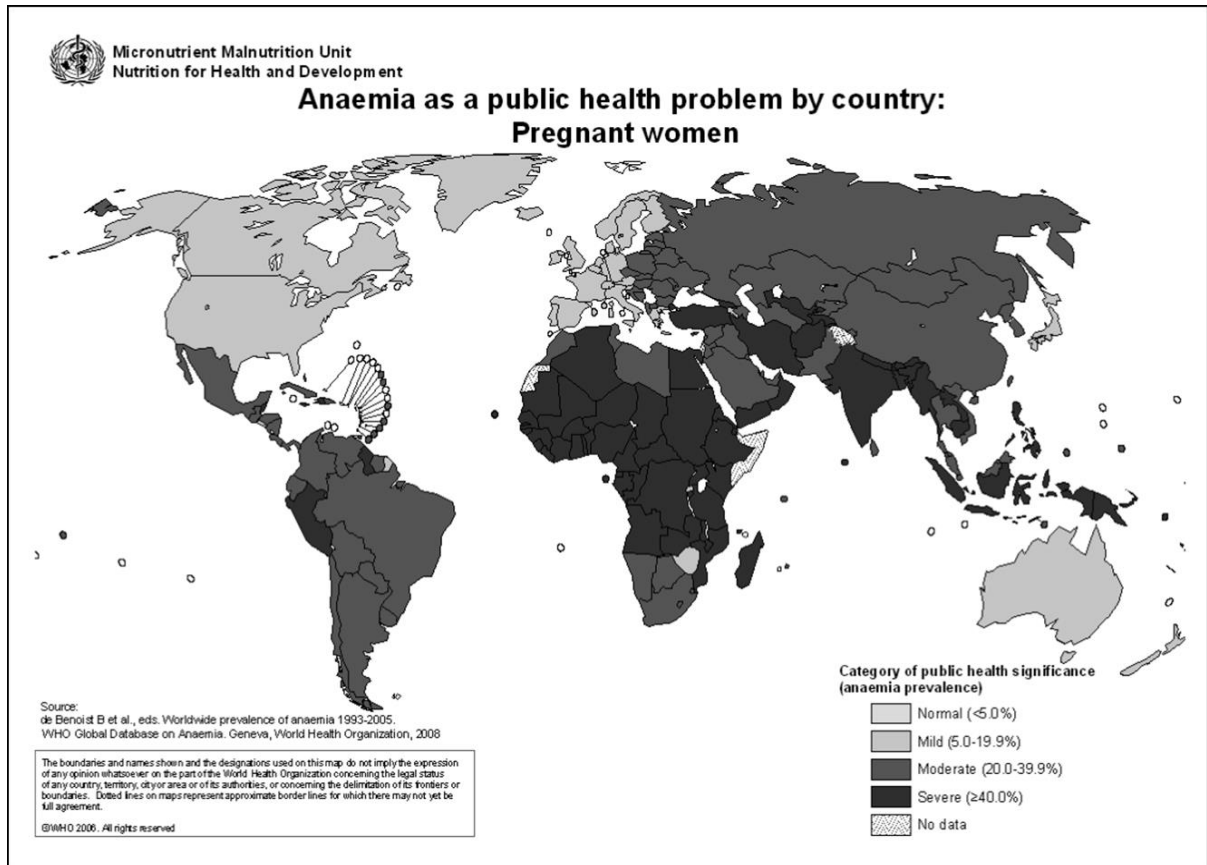
A anemia ferropriva é reconhecida como a carência nutricional de maior prevalência no mundo, atingindo países de todos os continentes, blocos geoeconômicos e grupos sociais.¹ De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), pode-se classificar a prevalência de anemia como normal ou aceitável (abaixo de 5%), leve (de 5 a 19,9%), moderada (de 20 a 39,9%) e grave (maior ou igual a 40%).¹ Apesar dos esforços em termos de políticas, programas e metas, incluindo as recomendações de suplementação universal com ferro à população materno-infantil desde os anos 80, as prevalências globais e continentais da anemia mantêm-se inalteradas.¹⁻⁴ Nas gestantes as prevalências permanecem em torno de 50% globalmente e de 30% na América Latina.³ Essa constatação aponta o insucesso das medidas de controle do problema e indica a existência de um grande contingente populacional sob risco de desfechos materno-fetais negativos, visto que a presença de anemia materna tem sido associada com baixo peso ao nascer e prematuridade,⁵⁻¹⁴ assim como com mortalidades materna e perinatal.¹⁵⁻¹⁷

A meta de redução em 30% nas prevalências de anemia ferropriva em gestantes até o ano 2000 não chegou a ser atingida em diversas regiões do mundo, apesar de ter sido a mais tímida do plano decenal de saúde materno-infantil para os países membros das Nações Unidas (*United Nations Children's Fund – UNICEF*).¹⁸ Em 1996, a comissão técnica do UNICEF elevou o problema ao nível de crise na saúde pública na Ásia Central e Cazaquistão, diante das altas prevalências regionais de anemia ferropriva em crianças (60%) e gestantes (80%).¹⁸ Por sua vez, em 1999, o relatório regional da divisão da Europa Central e Oriental do UNICEF/OMS relatou frequências de anemia entre 40 e 50% em gestantes e de 50% em crianças abaixo dos cinco anos.¹⁸ Estimativas globais do primeiro ano deste século indicaram que 35.057.000 *disability-adjusted life years (DALY)* e 841.000 mortes seriam atribuídas à anemia e que a relação entre anemia materna e mortalidade perinatal contribuiu com 56% dessas mortes.⁴

Em 2006 80% das nações mantinham prevalências ao menos moderadas de anemia na gravidez, inclusive o Brasil com prevalência estimada em torno de 30% (vide mapa abaixo na Figura 1).³ Desse modo, o platô que vem se esboçando na carga da doença em nível mundial também se reproduz nas estimativas nacionais. Levantamentos brasileiros feitos nas últimas quatro décadas têm encontrado 20 a 40% de anemia em gestantes,^{3,19-21} destacando-se o estado de Pernambuco e a cidade de Recife com proporções das mais elevadas, em torno de 40%.²²⁻²⁵ Em 2009 foram divulgados os resultados do primeiro estudo com dados

representativos sobre anemia na população brasileira, a Pesquisa Nacional de Demografia e Saúde da Mulher (PNDS 2006), reportando prevalências de anemia em mulheres em idade fértil de 30% nacionalmente e de 40% na região Nordeste, no entanto sem amostras representativas de gestantes.²⁶

Figura 1 - Mapa da anemia materna no mundo



Fonte: Organização Mundial da Saúde.³

Ao lado da sua importância em termos de carga da doença, fortes evidências da associação da anemia materna, particularmente por carência de ferro, com a ocorrência de desfechos perinatais negativos têm se acumulado.⁵⁻¹⁷ Tem-se observado que as médias dos pesos e idades gestacionais dos recém-nascidos decrescem e as taxas de mortalidade perinatal elevam-se, acompanhando os extremos inferiores ou superiores das curvas de distribuição populacional dos valores de concentração de hemoglobina (Hb) da gestante.⁵⁻¹⁷ Essas associações foram investigadas nos seguintes grandes inquéritos da América do Norte e do Reino Unido: *National Collaborative Perinatal Project from the United States 1981* (~60.000 nascimentos)⁵; *Cardiff Births Survey from the United Kingdom 1986* (~55.000 nascimentos)⁶; *Survey from the North West Thames Region – United Kingdom 1995* (>150.000 nascimentos)⁸

e *St Mary's Maternit Information System – Northwest Thames Region, United Kingdom 1988-2000* (>220.000 nascimentos)¹⁷. Nessas populações, as taxas de mortalidade perinatal e os valores de peso e idade gestacional ao nascer apresentaram resultados gradualmente piores na presença de valores Hb materna acima ou abaixo de um intervalo ótimo, descrevendo, portanto, funções com curvas em forma de “U”^{5,6,8,17}

A associação entre anemia e esses desfechos reprodutivos (evidências de risco) representa o primeiro nível de evidências para o processo de desenvolvimento das estratégias de controle da anemia como problema de saúde pública.²⁷ O segundo nível de evidências, que indicaria a associação causal direta, seria demonstrado em ensaios clínicos randomizados, caso o tratamento eficaz da anemia materna resultasse em melhora dos desfechos reprodutivos (evidências de benefício).²⁷ Alguns estudos vêm demonstrando que o uso profilático de múltiplos micronutrientes durante a gravidez pode reduzir o risco de desfechos perinatais adversos, tais como baixo peso e prematuridade.^{9,28-32} No entanto, não há evidências acumuladas em favor do benefício do uso terapêutico do ferro em gestantes classificadas como anêmicas, visto que o benefício ou custo-benefício da ferroterapia no cenário rotineiro da assistência pré-natal ainda não foi comprovado com estudos de efetividade e ou de eficiência (evidências de factibilidade).^{27,32}

Desse modo, pode-se afirmar que a institucionalização da suplementação com ferro em larga escala para as gestantes vem se sustentando no primeiro nível de evidências e que não tem resultado no controle da anemia materna como problema de saúde pública.^{1,3} É crucial para o sucesso dos programas de controle que esses sejam pautados em níveis de evidências mais elevados demonstrados, ao menos, nos estudos de eficácia. No entanto, os ensaios clínicos com ferro oral em gestantes são marcados por altas frequências de má adesão terapêutica, de efeitos adversos gastrointestinais e de perdas;³³⁻⁴³ além de que não avaliam os desfechos materno-fetais.⁴³ A má adesão terapêutica e os efeitos adversos são considerados os principais responsáveis pelo insucesso das intervenções com ferro,^{18,33-43} todavia, ainda que seja assegurada a ingestão de uma dose total de ferro considerada eficaz, as taxas de cura de anemia materna nos ensaios terapêuticos situam-se em torno de 50%.^{34,42,43}

Por conseguinte, além de fatores relacionados à dose total de ferro ingerida, dificuldades na correta identificação da doença podem estar implicadas nas falhas terapêuticas. Portanto, é primordial que a definição da anemia ferropriva materna e os seus critérios diagnósticos estejam bem estabelecidos para que os estudos de intervenção ocorram com minimização dos vieses de seleção, resultando em amostras verdadeiramente ávidas por ferro e em resultados que possam embasar intervenções populacionais mais resolutivas.

1.1 A definição de anemia: o paradigma Gaussiano da normalidade e o diagnóstico da anemia materna

A anemia é definida funcionalmente como um estado de hemoglobina circulante insuficiente para o transporte de oxigênio demandado para as atividades fisiológicas e é diagnosticada laboratorialmente quando o montante circulante da massa total de células vermelhas (*eritron*) está abaixo do limite considerado normal (média menos dois desvios-padrão).^{1,44-46} O *eritron* circulante é mensurado indiretamente pela contagem de células vermelhas (eritrometria); pela concentração sanguínea de hemoglobina (Hb) e pelo hematócrito (HTC), que consiste na porcentagem do volume de conglomerado de hemácias em sangue total.⁴⁷ Igualmente, na gestante, a anemia é diagnosticada utilizando-se os limites inferiores de Hb e HTC definidos com base na curva de Gauss (média menos dois desvios-padrão) obtida de uma população de referência.^{1,44}

A OMS e o *Centers for Disease Control and Prevention (CDC)* recomendam, para o diagnóstico de anemia durante a gravidez, os pontos de corte de 11,0 g/dL para a Hb e de 33,0% para o HTC, que são derivados de curvas de distribuição de seus valores reportadas em mulheres suplementadas com ferro de estudos norte-americanos e europeus ocorridos entre as décadas de 70 e 90.^{1,45,46} Esses critérios diagnósticos têm sido adotados para se estimar as prevalências de anemia e de deficiência de ferro, bem como, para a indicação de intervenções coletivas ou individuais com reposição de ferro.¹⁻⁴ A princípio, dois aspectos relativos a esses critérios levantam questionamentos: o poder de generalização de observações provenientes de uma população de referência tão distinta e a definição de normalidade aplicada.

A uniformização de protocolos em nível mundial é um desafio, dado que as características epidemiológicas e biológicas das diversas populações não são uniformes. No caso das anemias, fatores étnicos, nutricionais e infecciosos são distintos entre as diferentes regiões do planeta, especialmente quando se comparam populações de países desenvolvidos com as de países em desenvolvimento.^{3,27,48} Desse modo, pode-se afirmar que um critério uniforme para o diagnóstico de anemia materna torna-se vulnerável a erros de interpretação quando aplicado em populações com características demográficas e biológicas distintas. Stoltzfus,⁴⁸ por exemplo, observou que não havia diferenças entre as prevalências de anemia em inquéritos de uma série de países em desenvolvimento, ao aplicar o ponto de corte de 11 g/dL; no entanto, quando reduziu o critério diagnóstico para 9 g/dL, verificou variações nas prevalências que se tornaram condizentes com os respectivos graus de implantação dos programas de combate à carência de ferro nos países estudados. Esses achados sugerem que o

ponto de corte corrente, derivado de gestantes repletas de ferro de países desenvolvidos, pode não ser adequado para discriminar gestantes ferro-suficientes e ferro-deficientes em populações de países em desenvolvimento.

Esse e outros pontos de corte de Hb recomendados derivam do paradigma Gaussiano que se apoia numa *definição estatística* da normalidade. Esse conceito estabelece como normal o intervalo central de valores correspondentes a 95% das observações em uma curva de distribuição populacional de parâmetros clínicos ou laboratoriais. Consequentemente, esse critério pressupõe prevalências arbitrárias de 5% para o que seria considerado anormal, percentual que pode não se adequar a uma série de doenças com seus respectivos contextos clínicos e epidemiológicos.⁴⁹ Em contraponto, já nos anos 70, informes da OMS consideravam que pontos de corte de Hb definidos a partir de distribuições populacionais poderiam resultar em uma simplificação excessiva do panorama mundial das anemias, enfatizando a necessidade de se realizarem estudos piloto e de se conhecer o quadro epidemiológico de cada região antes da implementação de medidas de controle.² Para tanto, é importante que se apliquem métodos laboratoriais e critérios diagnósticos apropriados,⁴⁹ estabelecidos com base no conceito de normalidade que melhor se aplique ao caso da anemia ferropriva materna.

O paradigma Gaussiano é bastante utilizado para se definirem faixas normais de parâmetros laboratoriais ou clínicos, tais como valores do hemograma e medidas antropométricas; no entanto, nas últimas décadas, com o desenvolvimento da epidemiologia clínica, vem perdendo espaço para outras definições de normalidade, tais como a definição diagnóstica, a definição prognóstica e a definição terapêutica.⁴⁹ Como exemplo, os pontos de corte dos níveis glicêmicos são frequentemente redefinidos com base em grandes estudos longitudinais de longo prazo que associam valores de glicemia a desfechos desfavoráveis da doença (*definição prognóstica*); da mesma forma os níveis pressóricos ótimos vêm sendo recomendados com base na associação entre os valores de pressão arterial e o efeito de tratamentos anti-hipertensivos sobre marcadores da doença, tal como hipertrofia ventricular esquerda (*definição terapêutica*).⁴⁹

A *definição diagnóstica* é utilizada quando a acurácia e os valores normais de um novo teste são estabelecidos em relação a um padrão-ouro para a doença-alvo.⁴⁹ A ferritina, por exemplo, teve os seus pontos de corte para o diagnóstico da deficiência de ferro testados em dois estudos que compararam os seus valores séricos com o conteúdo de ferro medular na população geral e em gestantes.^{50,51} Alguns poucos estudos também descrevem a acurácia dos índices eritrocitários comparados a padrões de referência para a deficiência de ferro,⁵⁰⁻⁵⁶ e

raros têm descrito as curvas *Receiver Operating Characteristic (ROC)* desses parâmetros, das quais derivariam pontos de corte baseados na definição diagnóstica.^{54,56} Por sua vez, uma busca sistemática em uma série de bases de dados (MEDLINE, SCIELO, LILACS, Cochrane, Embase), utilizando as palavras-chave '*anemia – iron deficiency*', '*pregnancy*', '*erythrocyte indices*', '*ferritins*', '*sensitivity*' and '*specificity*' não identificou estudos que até então tenham aplicado o critério terapêutico da normalidade na validação de testes hematológicos para o diagnóstico de anemia ferropriva em gestantes. Não obstante, os critérios diagnósticos para anemia materna não têm sido baseados na definição prognóstica da normalidade, apesar da associação observada entre a presença de anemia ferropriva materna e desfechos perinatais indesejados.

Os três primeiros grandes inquéritos norte-americano e britânicos citados anteriormente observaram que, de forma geral, as frequências de baixo peso ao nascer e de prematuridade foram menores quando a Hb materna encontrava-se dentro de intervalos compreendidos entre 8,5 e 12,5 g/dL,^{5,6,8} Percebe-se que o valor intermediário entre os valores mínimos e máximos dos intervalos corresponde ao ponto de corte de Hb atualmente empregado no diagnóstico de anemia materna (11 g/dL).^{6,8} Sendo assim, de acordo com os protocolos correntes,¹ metade das gestantes que conceberam neonatos com peso e idade gestacional ao nascer mais favoráveis seriam classificadas como anêmicas e submetidas à reposição de ferro. Por sua vez, o inquérito britânico mais recente, baseado em um dos maiores bancos de dados validados do mundo, no que se refere a populações de gestantes, reportou que menores taxas de mortalidade perinatal ocorreram em uma faixa ótima de Hb materna ainda mais baixa, entre 9 e 11 g/dL.¹⁷

Essas disposições são um ponto de partida para que se pense o diagnóstico da anemia e da deficiência de ferro também de maneira funcional e não como uma mera definição estatística, tendo em vista que a deficiência de ferro constitui-se em um espectro de doença, onde apenas o estágio mais avançado será caracterizado pelo surgimento da anemia.^{1,47} Esta, por sua vez, não é uma entidade única, mas expressa uma disfunção eritróide que pode ter múltiplas causas, tais como deficiências nutricionais, doenças hereditárias e doenças infecto-parasitárias.^{27,57} Adicionalmente, na gravidez, a hemodiluição fisiológica e o aumento da demanda por ferro constituem-se em fatores de confusão na identificação das gestantes verdadeiramente ferro-deficientes.²⁷

1.2 A hemodiluição fisiológica da gravidez e suas implicações na avaliação laboratorial da anemia: do diagnóstico à mensuração da resposta à ferroterapia

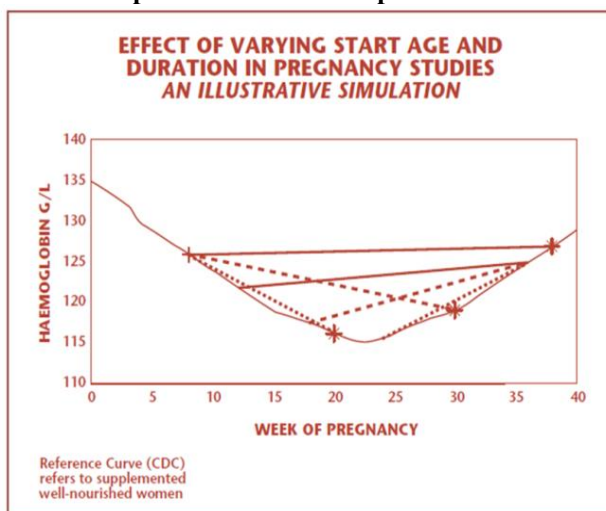
A hemodiluição gravídica é caracterizada pela expansão do volume plasmático em 50% *versus* 30% de incremento na massa eritrocitária.^{45,58,59} O volume plasmático cresce mais rapidamente no segundo trimestre da gestação e atinge o máximo na 24ª semana, quando se estabiliza por algumas semanas, seguindo-se contração progressiva que pode resultar em leve hemoconcentração próximo ao termo.^{27,45} A “anemia fisiológica” da gravidez não seria, portanto, uma anemia verdadeira, pois a massa eritrocitária mantém-se normal em relação ao peso corporal efetivo.⁵⁹ Como resultado da hemodiluição, associada a alterações na homeostase eritropoiética, os valores dos índices eritrocitários e dos vários biomarcadores séricos para avaliação do *status* de ferro oscilam durante a gravidez, o que dificulta a sua interpretação.^{27,60} Tem-se observado que os valores de Hb, HTC e eritrometria se comportam seguindo uma curva fisiológica, com concavidade voltada para cima e nadir por volta da 24ª a 28ª semanas de gestação, quando Hb e HTC chegam a cair em média 0,6 g/dL e 2%, respectivamente, e depois disso voltam a se elevar atingindo níveis pré-gravídicos aproximadamente na 6ª semana do puerpério.^{50,61-65}

Por sua vez, estudos sugerem que, como resultado da acelerada utilização dos estoques de ferro, o grau de hemoglobinização dos eritrócitos cai progressivamente no transcurso da gravidez normal, acentuando-se ao final do 3º trimestre, como pode ser observado nos valores de hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM).⁶¹⁻⁶⁵ Por outro lado, o incremento na atividade eritropoiética, resultando na liberação de eritrócitos jovens para o sangue periférico, tem sido implicado na elevação do volume corpuscular médio (VCM),^{50,62,63} assim como do *RDW* (*red blood cells distribution width*) e dos reticulócitos.⁶⁴⁻⁶⁷ Outros estudos observaram que os valores séricos de ferritina elevam-se no 1º trimestre, provavelmente devido ao aumento da mobilização do ferro, sofrem queda fisiológica de 30 a 50% no 2º trimestre, devido à hemodiluição, e voltam a subir em seguida; todavia, no pós-parto não chegam aos valores pré-gravídicos, o que se atribui ao desvio do ferro materno para o complexo feto-placentário.³⁵⁻⁴²

Considerando o fenômeno da hemodiluição gravídica, Beaton e McCabe,²⁷ com base na distribuição dos valores de Hb em populações de gestantes norte-americanas e europeias repletas de ferro, reportada pelo *CDC*, propuseram a aplicação do método do escore Z para corrigir os valores de Hb de acordo com a idade gestacional. Essa metodologia quantifica, em unidades de desvios-padrão, a diferença entre um valor observado da Hb e a média de

referência esperada para a semana de gestação correspondente. Esses autores partiram do pressuposto de que medidas sequenciais da Hb durante a gravidez refletem um segmento da curva fisiológica da Hb num dado período observado, o que poderia distorcer avaliações de eficácia durante o seguimento de intervenções com ferro, como está graficamente representado na Figura 2 abaixo. Esses pesquisadores realizaram uma metanálise de uma série de ensaios com ferro oral em gestantes e encontraram importante heterogeneidade entre os estudos, sendo que o cálculo das estatísticas sumárias só foi possível após a homogeneização dos estudos com a aplicação do escore Z. Os autores observaram que os resultados de eficácia terapêutica aferidos pelas diferenças entre Hb inicial e final em escores Z foram distintos dos previamente relatados nos estudos originais em valores absolutos.²⁷

Figura 2 - Curva de referência dos valores de Hb ao longoda gravidez (os segmentos de reta representam os efeitos hipotéticos de ferroterapias iniciadas em idades gestacionais diferentes e com durações diversas)



Fonte: Beaton e McCabe.²⁷

Apesar de método teoricamente mais adequado para avaliação do *status* de hemoglobina no ciclo gravídico, o escore Z da Hb não tem sido aplicado para identificar gestantes anêmicas ou para avaliar a eficácia nos estudos de intervenção com ferro em gestantes.^{43,68} Na última metanálise sobre eficácia de ferroterapia para o tratamento de anemia na gravidez,⁴³ dois estudos compararam o uso diário e intermitente de ferro oral. O primeiro, de Mumtaz *et al*,⁶⁹ foi o único dentre os 23 ensaios clínicos a aplicar o escore Z da Hb e encontrou resultados favoráveis ao uso da posologia diária, estando em consonância com as conclusões prévias de Beaton e McCabe.²⁷ No entanto, o ensaio de Souza *et al*,⁷⁰ utilizou os níveis absolutos de Hb como critério indicativo de necessidade do tratamento e de cura, encontrando resultados animadores com uso de ferroterapia intermitente.⁷⁰

Essas discrepâncias exemplificam como os critérios diagnósticos aplicados para indicação de tratamento e para detecção de resposta hematológica podem modificar os resultados de ensaios clínicos, ainda que seja garantida a administração de uma dose total de ferro eficaz. Em suma, assim como a mensuração confiável do efeito hematológico final é crucial para a avaliação das intervenções clínicas e coletivas com ferroterapia em gestantes, a acurada identificação de pacientes ávidas por ferro na linha de base é imprescindível para a seleção acertada da população a ser tratada; dado que a resposta terapêutica está na dependência do grau inicial de anemia e de deficiência de ferro dos indivíduos a serem tratados.^{68,71}

1.3 O diagnóstico da deficiência de ferro materna: a multicausalidade das anemias e a inacurácia dos biomarcadores de ferro corporal durante a gravidez

A deficiência de ferro em gestantes pode ser definida funcionalmente como níveis insuficientes de ferro mobilizável para suprir a demanda eritropoiética da gravidez.¹ De acordo com recomendações da OMS, os custos com o diagnóstico da carência de ferro devem ser proporcionais à disponibilidade dos recursos regionais, inclusive quando se trata de gestantes.¹ Em países com recursos escassos dever-se-ia utilizar as informações da análise eritrocitária, particularmente HTC e Hb, para se estimar o *status* de ferro; ao passo que, em locais com recursos intermediários ou adequados, a dosagem de biomarcadores do metabolismo de ferro poderia ser realizada, tanto na prática médica individual como coletiva.¹ Desse modo, baixos valores de Hb ou HTC vêm sendo considerados como *proxy* de deficiência de ferro e amplamente empregados nas últimas décadas como critérios para guiar as intervenções com ferro em gestantes nos países em desenvolvimento.^{1,3,48} Consequentemente, o pressuposto de que a carência nutricional de ferro seria responsável por quase a totalidade dos casos de anemia no mundo subverteu a importância de se conhecer o seu quadro etiológico, particularmente nessas localidades.

Contudo, vários estudos conduzidos no Ocidente e no Oriente, após o desenvolvimento dos ensaios laboratoriais para a dosagem sérica da ferritina na década de 70, observaram que, em geral, a anemia na gravidez está associada à deficiência de ferro em menos da metade dos casos, havendo proporções consideráveis de outras causas, tais como infecção urinária, doenças crônicas, malária, deficiência de vitaminas e hemoglobinopatias.^{50-57,72-75} Corroborando essas observações, os últimos informes da OMS apontam a deficiência de ferro como responsável por modestos 50% das anemias no mundo e aconselham cautela no

uso isolado da Hb ou do HTC como critério diagnóstico da deficiência de ferro, principalmente nos contextos epidemiológicos com outras causas de anemia.³ Não obstante, as modificações fisiológicas de todos os valores do eritrograma e da ferritina sérica durante a gravidez constituem-se em um importante fator de confusão na determinação de critérios válidos para o diagnóstico de anemia ferropriva materna.

Estudos têm demonstrado que os índices eritrocitários, dentre eles Hb e HTC, apresentam baixa correlação com as reservas de ferro corporal em gestantes.^{51-56,76} Apesar de existirem pontos de corte de Hb e HTC específicos para a gestação,⁴⁴ suas sensibilidades e especificidades situam-se em torno de 60% para o diagnóstico de deficiência de ferro materna, quando confrontados com biomarcadores do metabolismo de ferro ou com o conteúdo do ferro medular.^{51-56,76} No último *National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES)/1999-2006* o critério da Hb apresentou sensibilidade de apenas 16% para detectar gestantes sem estoques de ferro.⁵⁷ Essas evidências não sustentam o uso desses parâmetros como testes de triagem para anemia ferropriva em gestantes;^{51-56,76} e indicam que, uma grande proporção desse estrato populacional está sujeita a erros de classificação diagnóstica e à condução equivocada de sua anemia. No entanto, a Hb como teste isolado e sem ajustes para a semana de gestação continua sendo o mais difundido,^{1,45,46,57} tanto na identificação de gestantes para tratamento, como na avaliação de eficácia da ferroterapia.⁴³

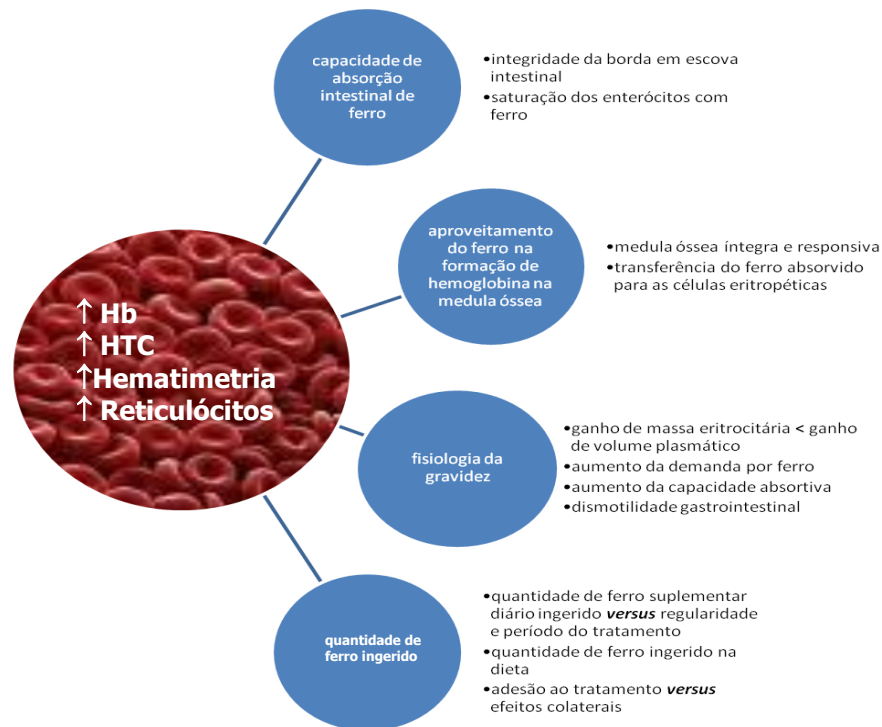
Pode-se concluir que, diferentemente da população geral,⁴⁷ na gravidez, os índices de massa eritrocitária (Hb, HTC, eritrometria) podem não expressar o *eritron* efetivo. Por sua vez, os índices eritrocitários que expressam a morfologia dos glóbulos vermelhos (tamanho e grau de hemoglobinação) têm apresentado sensibilidades igualmente baixas para o diagnóstico de deficiência de ferro materna (abaixo de 40%);^{51-56,76} a despeito de que, na população geral, a presença de hemácias pequenas (baixo VCM), pálidas (baixos HCM e CHCM) e com grande variabilidade de seus volumes (*RDW* alto) em sangue periférico é conhecida associada à anemia ferropriva.⁴⁷ Durante a gravidez, sabe-se que a eritropoiese emergencial e a hemodiluição provocam oscilações nos valores dos índices morfológicos,⁶¹⁻⁶⁷ e, portanto, é provável que na gestação os resultados desses testes não tenham o mesmo significado nosológico. No entanto, como os seus valores usualmente não extrapolam a faixa considerada normal, são utilizados empregando-se os mesmos pontos de corte recomendados para a população geral de mulheres em idade fértil repletas de ferro.⁴⁴

Tanto na grávida, como na população geral, o exame padrão-ouro para avaliar o conteúdo corporal de ferro seria a coloração de ferro medular, porém, é de interpretação subjetiva e semiquantitativa e seu caráter invasivo impede o uso rotineiro.⁴⁷ Diante da falta de

padronização da maioria dos biomarcadores do metabolismo de ferro na gravidez (ferro sérico, ferritina, transferrina, saturação da transferrina, capacidade de ligação da transferrina, receptor solúvel da transferrina, complexo ferro-ferritina, saturação da ferritina), a dosagem sérica da ferritina ainda tem sido considerada o mais acurado.^{1,57,60} Contudo, a escassez de estudos de validação não permite um consenso sobre que ponto de corte da ferritina representa a privação funcional de ferro,^{51,76} tendo em vista que os seus valores também variam durante o ciclo grávido-puerperal e que as gestantes usualmente possuem ferritinemia próxima do limite inferior.^{1,60} É importante observar ainda que os limites inferiores recomendados pelo *CDC* e pela *OMS* para a ferritina sérica na gestação coincidem com os estudos que reportam distribuições populacionais, cujos resultados mostram uma curva com assimetria positiva e quinto percentil em torno de 12-15 ng/mL.^{54,62,63,74} Desse modo, considerações similares às que foram discutidas quanto à inadequação do critério estatístico Gaussiano para determinar pontos de corte de Hb podem ser transpostas para o critério da ferritina.

Estratégias diagnósticas alternativas têm sido descritas, na tentativa de melhorar o desempenho dos testes hematológicos para o diagnóstico de anemia ferropriva na gravidez. Modelos de múltiplos testes foram propostos por Casanova *et al.*,⁵⁶ combinando escores para Hb, *RDW* e idade gestacional; no entanto, o seu modelo final não resultou em melhora importante da acurácia: sensibilidade de 45% e especificidade de 88%. Por fim, a documentação da resposta à reposição com suplementos de ferro constitui-se alternativa diagnóstica considerada específica e econômica para se detectar a carência de ferro, tanto num contexto clínico como na dimensão coletiva.^{1,60} Aumentos na Hb ou na ferritina sérica são considerados ainda hoje os mais eficientes indicadores da resposta às intervenções com ferro;^{68,77} sendo que aumentos de pelo menos 1 g/dL na Hb ou 3% no HTC após 30 a 60 dias de suplementação refletem a presença de avidez pelo ferro, ou seja, a deficiência funcional de ferro, particularmente, quando não existem outras causas de anemia associadas.^{1,47,60} A aplicação de teste terapêutico pode ser vantajosa na gravidez, tendo em vista o incremento da absorção intestinal de ferro,⁷⁸ no entanto, deve ser encarada com cautela, devido aos fatores que podem modificar a resposta terapêutica, tais como os altos índices de queixas gastrointestinais e má adesão terapêutica (25-70%)³³⁻⁴² e a hemodiluição fisiológica (Figura 3).

Figura 3 - Modelo teórico da resposta à ferroterapia oral na gravidez



Fonte: figura produzida pela autora

1.4 Os três estudos da tese: pressupostos, problemas, *rationale* e hipóteses

Esta tese partiu dos pressupostos de que os programas com reposição de ferro oral em larga escala não têm obtido sucesso no controle da anemia materna e que isto pode estar relacionado à insuficiência dos critérios diagnósticos utilizados nos protocolos atuais, para a identificação de gestantes ferro-deficientes e para a aferição da resposta hematológica à ferroterapia. Esta afirmativa poderia explicar, em parte, a persistência da anemia materna como problema de saúde pública, visto que aponta a possibilidade de erros de estimação das prevalências, assim como erros de classificação diagnóstica que podem resultar no manejo inadequado dos casos na prática clínica ou coletiva. Desse modo, esta tese se propôs a reunir um conjunto de evidências, investigadas sequencialmente em três estudos com populações de gestantes, que permitissem questionar o paradigma de que a presença de anemia ferropriva em uma população seria definida por um *conceito mais estatístico do que fisiológico*, de acordo com a OMS.¹

Como primeiro problema, destaca-se que os pontos de corte da Hb (e de outros índices eritrocitários), correntemente utilizados para o diagnóstico de anemia e de deficiência de ferro, foram determinados com base em curvas de distribuição populacional, estimadas pelo segundo *NHANES*, na década de 80.⁴⁵ Esse inquérito norte-americano não dispunha de amostras representativas de gestantes e, por conseguinte, as curvas foram construídas utilizando-se dados de gestantes ferro-suplementadas de estudos clínicos europeus das décadas de 70 e 80.^{45,46} O *NHANES* 1999-2006 foi o primeiro a avaliar o *status* de ferro em uma amostra representativa de gestantes e foi recentemente publicado; contudo, curvas com esses dados genuinamente populacionais ainda não estão disponíveis na literatura.⁵⁷ No Brasil, igualmente, os inquéritos sobre o estado nutricional da população não têm incorporado subamostras consideráveis de gestantes.²⁶

Por conseguinte, não se conhece até que ponto as distribuições de frequência desses testes na nossa população de referência seriam comparáveis às curvas de referência reportadas em tempo e espaço tão distintos. Sendo assim, o **primeiro estudo** da tese foi concebido com o propósito de descrever a distribuição dos valores dos índices eritrocitários em uma amostra de gestantes não suplementadas com ferro, provenientes da mesma localidade onde a tese foi conduzida e estimar a frequência de anemia e hipoferritinemia. Nesse primeiro momento, consideraram-se as **hipóteses** de que os índices eritrocitários teriam os seus valores distribuídos diferentemente das curvas de referência internacionais, derivadas de gestantes repletas de ferro, e de que haveria uma alta frequência de anemia e deficiência de ferro na nossa população sem suplementação de ferro.

Por sua vez, o conhecimento científico sobre a utilidade diagnóstica dos testes hematológicos rotineiramente empregados na avaliação da anemia ferropriva na gravidez é marcado por importantes lacunas. Os pontos de corte da ferritina sérica e dos índices eritrocitários não foram estabelecidos com base em estudos de validação (definição diagnóstica da normalidade), e sim a partir de conceitos estatísticos de normalidade.^{1,45,46} Os estudos de validação de fase I,⁴⁹ descrevendo as faixas de valores desses testes entre gestantes ferro-deficientes e ferro-suficientes, são escassos e realizados em amostras reduzidas de gestantes com características étnicas singulares;^{50,56,76,79} assim como os estudos de fase II,⁴⁹ comparando resultados positivos e negativos dos testes com um padrão-ouro.^{51,76} Portanto, faltam evidências que sustentem a validade diagnóstica desses testes na identificação de gestantes que necessitam da reposição de ferro. Ademais, a confiabilidade do parâmetro mais frequentemente utilizado para avaliar a eficácia de intervenções com ferro, a diferença entre os valores de Hb antes e depois dos tratamentos,^{43,68} deve ser questionada, tendo em vista as

distorções provocadas pelo fenômeno da hemodiluição gravídica.²⁷

Desse modo, o **segundo estudo** desta tese foi delineado *a posteriori* com dados de um ensaio clínico prévio que acompanhou gestantes da mesma localidade, e teve o propósito de investigar esses dois momentos de provável falibilidade do critério da Hb; primeiramente, na identificação de gestantes com hipoferritinemia e, em seguida, na verificação da resposta a ferroterapias orais aplicadas às gestantes presumidamente ferro-deficientes. Essas análises constituíram-se em passo intermediário no desenvolvimento da tese, visto que verificou, em desenho de fase II, a acurácia diagnóstica dos índices eritrocitários e pré-testou a metodologia do escore Z da Hb para a mensuração de eficácia terapêutica, a ser aplicada no terceiro estudo. O estudo foi desenvolvido a partir das **hipóteses** de que a Hb e os outros índices eritrocitários, em seus pontos de corte estáticos e estabelecidos externamente, teriam baixa acurácia para identificar gestantes com hipoferritinemia; além de que o uso da Hb em valores absolutos incorreria em viés na aferição da eficácia da ferroterapia.

Por fim, não se encontram na literatura estudos pragmáticos de fase III e IV, que avaliem esses testes hematológicos na prática do cuidado pré-natal, respectivamente, para determinar a acurácia diagnóstica em gestantes com suspeita clínica da deficiência de ferro ou para verificar o impacto na condução e ou nos desfechos dos casos.⁴⁹ Essas constatações motivaram a realização da pesquisa original desta tese, desenhada *a priori* como um estudo de validação de fase III, constituindo-se no **terceiro estudo** a ser apresentado. O propósito deste estudo foi o de avaliar, na prática do cuidado pré-natal, a utilidade diagnóstica da ferritina sérica e de cada teste único do eritrograma para a identificação de gestantes ávidas por ferro que se beneficiariam da ferroterapia oral através da melhora de seu *status* de hemoglobina.

Para atender a essa expectativa, diante da inexistência de um padrão-ouro ideal para a deficiência de ferro materna e contando com o problema das oscilações fisiológicas dos parâmetros hematológicos durante a gravidez, aplicou-se um **rational** funcional, com base na *definição terapêutica da normalidade*, ao se utilizar o teste terapêutico com ferro oral como o padrão-ouro da doença-alvo (deficiência de ferro materna). Considerando ainda as críticas dissertadas concernentes à utilização dos valores absolutos de Hb como ferramenta para mensurar a resposta à ferroterapia na gestação, a aferição desse padrão-ouro alternativo foi relativizada por meio da transformação dos valores de Hb em escores Z. A **hipótese** deste estudo final foi de que os índices eritrocitários e a ferritina sérica teriam baixo poder para prever a avidez pelo ferro e para discriminar as gestantes anêmicas que responderiam ou não à ferroterapia.

2 OBJETIVOS

As hipóteses desta tese foram testadas em três fases, cada uma das quais correspondeu a um estudo original com a finalidade de abordar um ou mais objetivos, como relacionados a seguir.

2.1 Estudo 1 - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?

- a) Conhecer as curvas de distribuição dos índices eritrocitários numa população de mulheres no segundo trimestre da gestação de baixo risco, sem suplementação com ferro, residentes na região metropolitana do Recife;
- b) Verificar a correlação entre os valores de HTC e Hb;
- c) Estimar a frequência de anemia e de hipoferritinemia nessa população.

2.2 Estudo 2 - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina

- a) Avaliar a acurácia dos valores pré-tratamento da Hb e de outros índices eritrocitários para o diagnóstico de deficiência de ferro em gestantes, utilizando a ferritina sérica como padrão-ouro;
- b) Comparar a eficácia terapêutica de três esquemas de tratamento com ferro oral entre estratos de mulheres com e sem deficiência de ferro antes do tratamento;
- c) Comparar os resultados globais e estratificados da eficácia terapêutica obtidos através dos valores absolutos de Hb com os obtidos em escores Z de Hb.

2.3 Estudo 3 - Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica no diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez

a) Analisar os parâmetros de acurácia diagnóstica dos índices eritrocitários e da ferritina sérica pré-tratamento para prever a resposta à ferroterapia em gestantes pré-classificadas como anêmicas ($Hb < 11,0$ g/dL) e para discriminar gestantes ferro-deficientes e ferro-suficientes, tomando como padrão-ouro a *resposta a teste terapêutico com ferro oral*.

3 MÉTODOS

Os estudos que compõem esta tese foram desenvolvidos com base em dados prospectivos de mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação de baixo risco, compreendendo resultados dos valores de ferritina sérica pré-tratamento e de eritrogramas pré e pós-tratamentos com ferroterapia oral, assim como, dados referentes à adesão terapêutica e aos efeitos adversos relacionados às intervenções com ferro oral. Os dois primeiros estudos foram realizados utilizando um banco de dados primários de um ensaio terapêutico conduzido há mais de 10 anos com gestantes assistidas no mesmo serviço de pré-natal,⁷⁰ resultando nos dois primeiros artigos apresentados. O terceiro estudo foi realizado como pesquisa original contemporânea desta tese, resultando na construção de um protocolo de pesquisa e de um novo banco de dados primários prospectivos, que originaram, respectivamente, o terceiro e o quarto artigos. O consentimento livre e esclarecido foi obtido de todas as participantes das duas populações estudadas. As análises secundárias do primeiro e segundo estudos receberam a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP sob o nº 650/05, assim como o terceiro estudo (nº 2050/10) que, além disso, foi registrado no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos do Ministério da Saúde (<http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-237wbg>).

O primeiro banco de dados foi resultado do ensaio clínico prévio conduzido no ano de 2001 no ambulatório de pré-natal do Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP), cujas análises primárias sobre a eficácia de três diferentes esquemas com ferro oral foram publicadas anteriormente e não se relacionam com a tese.^{42,70} Esse banco foi explorado nesta tese através de análises secundárias com três delineamentos *a posteriori*. Primeiramente, foi realizado um estudo transversal descritivo, contido no artigo I, e, posteriormente, um estudo de validação de fase 2 associado a uma reanálise de eficácia terapêutica, apresentado no artigo II. O segundo banco de dados foi construído a partir do ensaio clínico original desta tese, desenhado *a priori* como estudo de validação de fase 3 e conduzido em uma população de gestantes procedentes da mesma localidade da população do primeiro banco, como está descrito nos dois últimos artigos da tese (terceiro estudo). As curvas de distribuição dos índices eritrocitários e da ferritina sérica reportadas pelo CDC em populações de gestantes repletas de ferro, provenientes de países desenvolvidos,^{45,46} foram utilizadas como padrões de referência no desenvolvimento dos três estudos.

3.1 Estudo 1 - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?

Os métodos utilizados no primeiro estudo estão em detalhes no artigo I, publicado em 2009. Foi realizada uma análise com delineamento transversal dos valores pré-tratamento dos índices eritrocitários e da ferritina sérica de gestantes de 2º trimestre de gestação recrutadas entre maio de 2000 e junho de 2001 para um ensaio clínico precedente, no serviço de pré-natal do IMIP - hospital terciário localizado ao nível do mar no nordeste do Brasil. Mulheres que usaram medicação contendo ferro nos 60 dias anteriores foram excluídas. Foram submetidas aos testes hematológicos 347 participantes que se encontravam entre 16 e 20 semanas de gestação única de baixo risco. A ferritina foi dosada no soro através de técnica de enzimaímoensaio e os eritrogramas foram obtidos através de contador automatizado de células e incluíram os seguintes índices eritrocitários: eritrometria, Hb, HTC, VCM, HCM, CHCM. As análises estimaram as frequências de anemia (Hb < 11,0 g/dL) e de hipoferritinemia (ferritina sérica < 12,0 ng/mL), e as distribuições de frequência, médias e desvios-padrão de cada um dos índices eritrocitários. O teste de Anderson-Darling foi utilizado para verificar a compatibilidade das variáveis com a distribuição normal de Gauss. O teste de Pearson foi utilizado para verificar a correlação entre os valores de HTC e Hb.

3.2 Estudo 2 - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina

Os métodos do segundo estudo desta tese estão detalhadamente descritos no artigo II, ainda não publicado e que compreendeu dois delineamentos, utilizando o mesmo banco de dados analisado no primeiro estudo. Primeiramente, com os dados de linha de base de uma subamostra das 318 mulheres que tinham resultados da ferritina sérica pré-tratamento, realizou-se uma análise transversal de estudo de validação fase 2 para verificar as estimativas de acurácia (sensibilidade, especificidade, valores preditivos, curva *ROC* e teste *kappa*) da dosagem pré-tratamento de Hb (teste índice) com relação ao critério da ferritina sérica como padrão-ouro para a deficiência de ferro, aplicando-se os pontos-de-corte sugeridos pela OMS e *CDC*: Hb < 11,0 g/dL e ferritina sérica < 12,0 ng/mL.^{1,45,46} Foi verificado *a posteriori* que o número de observações da subamostra era suficiente para se estimarem sensibilidade de 90%

e especificidade de 80% com erro relativo de 10%, assumindo uma frequência de 50% de anemia por deficiência de ferro na população do estudo.

Adicionalmente, aplicou-se um desenho analítico longitudinal com as 140 gestantes da população do ensaio clínico prévio que foram classificadas como anêmicas ($Hb < 11,0$ g/dL) e, então, arroladas aleatoriamente em um de três grupos de tratamento com drágeas de sulfato ferroso (60 mg de ferro elementar): grupo 1 – uma drágea semanal (n 37); grupo 2 – uma drágea duas vezes por semana (n 43); grupo 3 - uma drágea diária (n 37). Foram excluídos os dados de 10 mulheres que participaram do ensaio clínico, mas cujos resultados de ferritina sérica não estavam disponíveis. As mulheres foram tratadas durante 16 (± 1) semanas e submetidas a medidas de Hb na inclusão e ao final do seguimento.

A re-análise da eficácia terapêutica de cada grupo foi realizada em dois estratos, com e sem deficiência de ferro (ferritina sérica $< 12,0$ ng/mL), ajustando-se os valores de Hb pré e pós-tratamento de cada gestante de acordo a semana gestacional, através da transformação em escores Z, com base na seguinte equação: $\text{escore Z} = (\text{Hb observada} - \text{média de Hb esperada}) / \text{desvio-padrão (população de referência)}$. Consideraram-se as médias esperadas para cada semana de gestação (vide Anexo A) e o desvio-padrão (0,9 g/dL) da população de referência, conforme a metodologia proposta por Beaton e McCabe.²⁷ O teste t de Student foi aplicado para comparar as respostas terapêuticas entre os estratos (com ou sem deficiência de ferro) em cada um dos grupos de tratamento, com nível de significância de 5%.

3.3 Estudo 3 - Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica no diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez

O protocolo completo do terceiro estudo está publicado no artigo III desta tese. Este estudo foi delineado *a priori* como um estudo de validação fase 3, cujos testes índices compreenderam as dosagens pré-tratamento da ferritina sérica e dos índices eritrocitários (eritrometria, Hb, HTC, VCM, HCM, CHCM, RDW, contagem de reticulócitos), e o teste padrão-ouro, a *resposta a teste terapêutico com ferro oral*. A coleta de dados teve direcionamento prospectivo com o propósito de observar a resposta a uma intervenção do tipo antes-e-depois com sulfato ferroso oral. No período de agosto de 2011 a outubro de 2012, no serviço de pré-natal de baixo risco do IMIP, foram recrutadas 187 gestantes anêmicas, atendendo aos seguintes critérios: idade entre 18 e 35 anos, idade gestacional entre 12 e 32 semanas e $Hb \geq 7,0$ e $< 11,0$ g/dL. Foram excluídas 76 gestantes com histórico de

hipersensibilidade ou intolerância ao sulfato ferroso, transtornos ou déficits mentais; usuárias de tabaco, álcool ou outras drogas; diagnóstico prévio de outra causa de anemia; ou indícios de infecção no momento do arrolamento. Foi estimado previamente um tamanho amostral de 43 casos de deficiência de ferro e 97 não-casos, para que fossem detectadas sensibilidades de 90% e especificidades de 80%, com erro relativo de 10% e poder de 95%. Inicialmente, considerou-se que haveria 30% de perdas e que a nossa população de gestantes teria 50% de anêmicas,⁷⁰ ou seja, 50% da amostra selecionada seria representada por casos e 50% por não-casos, prevendo-se que seria necessário recrutar 278 mulheres. No entanto, uma análise interina realizada quando 187 gestantes haviam sido incluídas mostrou, que após 43 perdas, havia o número necessário de casos e não-casos, dentre as 144 participantes seguidas. Todavia, mais cinco gestantes tiveram que ser excluídas *a posteriori* por não terem atingido a adesão mínima necessária para a confiabilidade do padrão-ouro (ingestão de pelo menos 30 drágeas de sulfato ferroso), finalizando-se as análises com 37 casos e 102 não-casos (vide fluxograma do artigo IV).

As participantes foram avaliadas com exames clínicos e laboratoriais na inclusão e após 30, 60 e 90 dias (para os procedimentos do trabalho de campo vide o Apêndice A). Um questionário estruturado, assim como o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice B), foi aplicado individualmente pela equipe de pesquisa, utilizando um instrumento padronizado construído para a pesquisa e contendo as variáveis sociodemográficas e clínico-obstétricas (Apêndice C). Os eritrogramas foram realizados com contador automatizado de células, a contagem de reticulócitos foi feita manualmente em lâmina corada com azul brilhante de cresil e a ferritina sérica foi dosada com técnica de quimioluminescência. O tratamento foi iniciado até 24 horas após a coleta dos exames da inclusão e consistiu na prescrição de duas doses diárias de sulfato ferroso com 40 mg de ferro elementar por 90 dias.

Os testes índices (ferritina e índices eritrocitários) e o padrão-ouro (*resposta a teste terapêutico com ferro oral*) foram aferidos em todas as participantes de forma independente e cega, com um hiato de tempo de 28 a 90 dias, correspondente ao período decorrido entre o início e o término do tratamento de cada gestante. O padrão-ouro foi aferido individualmente através da diferença entre os escores Z da Hb pré-tratamento e pós-tratamento, sendo considerados positivos os casos de mulheres responsivas ao ferro ao final de 28 a 90 dias de tratamento. Caso de gestante ferro-responsiva foi definido como o aumento mínimo de 0,55 escore Z de Hb após pelo menos quatro semanas de tratamento com 30 drágeas de sulfato ferroso. Os escores Z foram calculados de acordo com a fórmula: $\text{escore Z} = (\text{Hb observada} - \text{média de Hb esperada}) / \text{desvio-padrão (população de referência)}$. Consideraram-se as médias

esperadas para cada semana de gestação (vide Anexo A) e o desvio-padrão (0,9 g/dL) conforme a metodologia proposta por Beaton e McCabe.²⁷ Para assegurar a ingestão de uma dose total de ferro eficaz, e assim minimizar o efeito de confusão na resposta terapêutica, os efeitos adversos e a adesão terapêutica foram monitorados e as gestantes foram orientadas e motivadas a cada consulta.

As análises foram realizadas de acordo com o desenho analítico *delayed-type cross-sectional*, tipo de estudo de validação no qual o diagnóstico definitivo da doença-alvo se baseia na ocorrência de desfechos verificados após um período de observação ou de tratamento.⁸⁰ Ao final do estudo foram estimadas sensibilidades, especificidades, valores preditivos, razões de verossimilhança, áreas sob as curvas *ROC (Receiver Operating Characteristic)*, *Odds Ratio* diagnósticas e testes *kappa* de cada teste, com seus respectivos intervalos de confiança de 95%, para o diagnóstico terapêutico da deficiência de ferro funcional de acordo com o padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral*. Para caracterizar a população de estudo, variáveis sociodemográficas, clínico-obstétricas, laboratoriais e relativas ao tratamento foram comparadas entre as duas amostras de casos e não-casos. As diferenças foram testadas utilizando-se os testes t de Student, do Qui-quadrado de Pearson, de Mann-Witney e exato de Fisher com um nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

Os resultados dos três estudos desta tese estão apresentados em quatro artigos originais, o primeiro deles, *Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?*, foi publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia em 2009, relatando a distribuição dos valores de eritrogramas de 347 gestantes sem uso de ferroterapia, que haviam sido triadas para um ensaio clínico mais de 10 anos atrás. Os achados são discutidos frente às curvas de referência reportadas pela OMS/CDC e aos relatos de outros poucos autores que se ocuparam de investigar esses parâmetros em populações de gestantes de outras localidades. O artigo foi objeto de editorial publicado no mesmo número da revista, ressaltando a relevância do tema, e que, portanto, foi incluído no corpo da tese, seguindo-se ao artigo propriamente dito.

O segundo artigo, intitulado *Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina*, apresenta os resultados do segundo estudo e não foi publicado até o momento da conclusão desta tese. O manuscrito apresenta as estimativas de acurácia da Hb para o diagnóstico de deficiência de ferro materna, aplicando a ferritina sérica pré-tratamento como padrão-ouro, a partir dos dados de linha de base da mesma população do primeiro estudo. Seguiu-se uma reanálise da eficácia terapêutica de três diferentes posologias de ferro oral na amostra selecionada para o ensaio clínico prévio, com a finalidade de comparar os resultados aferidos em valores absolutos de Hb com os obtidos após ajuste com os escores Z de Hb.

Os dois últimos artigos são resultados do terceiro estudo, que se constituiu no ensaio clínico original da tese. O protocolo deste estudo, *Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica para o diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez* foi publicado no *BMC Pregnancy and Childbirth* (fator de impacto = 2,83) e descreve o *rationale* desenvolvido na sua concepção, particularmente quanto à classificação do desenho de estudo, ao conceito de normalidade e ao método do escore Z utilizados no desenvolvimento de um padrão-ouro alternativo. Por fim, o artigo original *Acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica no diagnóstico da anemia ferropriva materna (AMA): um estudo sobre a predição da resposta terapêutica à ferroterapia oral* apresenta os resultados referentes à acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica para o diagnóstico de deficiência funcional de ferro materna, aplicando-se a resposta à ferroterapia oral como o padrão-ouro.

4.1 Artigo I - Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?

Erythrocyte indices in the second trimester of pregnancy: are reference values well established?

Instituição

Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP)

Autores

Cristiane C Bresani¹ (autor para correspondência)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550

Telefone/Fax: (+55) (81)21224781 / (+55) (81)21224722

e-mail: crisbresani@terra.com.br

Ariani I Souza² – aisouza@imip.org.br

Malaquias Batista-Filho¹ - malaquias.imip@gmail.com

¹Programa de Residência em Clínica Médica do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550).

²Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-infantil do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550).

Artigo publicado na Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia 2009; 31(1): 37-40. doi: 10.1590/S1516-84842009005000007

Editorial sobre o artigo: Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009; 31(1): 1.



Erythrocyte indices in the second trimester of pregnancy: are reference values well established?

Índices eritrocitários no segundo trimestre da gravidez: os valores de referência estão bem estabelecidos?

Cristiane C. Bresani¹

Ariani I. Souza²

Malaquias Batista Filho³

The erythrocyte index values in the pregnancy-puerperal cycle behave in a particular manner; however, the physiological or nosological meaning of such alterations are not well established. This study was aimed at analyzing the distribution of erythrocyte indices in the second trimester of pregnancy. The study was carried out with secondary data from 347 pregnant women in the 2nd trimester of low-risk prenatal care at the Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (Recife, Brazil) between May 2000 and June 2001. Measurements were performed using an automatic counter. Frequency distribution curves of erythrocyte indices (means and standard deviations) and correlation curves of hematocrit (HTC) and hemoglobin (Hb) concentrations were constructed. The mean red blood cell number (RBC) was 3.7×10^{12} cells/L; mean HTC was 32.9% and mean Hb was 10.8 g/dL; the values exhibited Gaussian distributions. The mean morphological values were 88.4 fL for the mean corpuscular volume; 29.0 pg for the mean corpuscular hemoglobin and 32.8 g/dL for the mean corpuscular hemoglobin concentration; these values were not adjusted to Normal distributions. HTC values were three times higher than Hb values. Mean RBC, HTC and Hb values (used in the diagnosis of anemia) were lower than thresholds considered normal and exhibited Gaussian distributions. Morphological indices remained within normal ranges, but without delineating a Normal curve. As expected HTC and Hb values behaved following a linear correlation. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 2009;

Key words: Anemia; iron deficiency; prenatal care; erythrocyte indices; pregnancy.

Introduction

Threshold erythrocyte indices values define anemia and its classifications, but vary with age, gender and physiological conditions such as pregnancy.^{1,3} Red blood cells number (RBC), haematocrit (HTC) and hemoglobin concentration (Hb) values indicate the erythroid mass, the

reduction of which results in anemia.^{1,2} Mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) indicate the morphology (size and degree of hemoglobinization) of the red blood cells, theoretically associated to the cause and functional classification of anemia.¹ The erythrocyte indices behave in a Gaussian manner in the general population.¹

¹Médica. Preceptora do Programa de Residência em Clínica Médica do IMIP, professora do Curso de Medicina da Escola Pernambucana de Saúde – FBV-IMIP.

²Médica. Professora do Curso de Medicina da Escola Pernambucana de Saúde – FBV-IMIP.

³Médico. Docente da Pós-graduação em Saúde Materno Infantil do IMIP, bolsista de produtividade do CNPq.

Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) – Recife-PE – Brasil.

Correspondência: Cristiane Campello Bresani

Departamento de Pesquisa do Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP) - Grupo de Estudos em Clínica Médica.

Rua dos Coelhos, 300 – Boa Vista

50070-550 – Recife-PE – Brasil

Tel. (+55 81) 2122-4779 – Fax. (+55 81) 2122-4782

Email: crisbresani@terra.com.br

The RBC, HTC and Hb values in the pregnancy-puerperal cycle behave following a physiological curve (concavity turned upward), with the lowest point between the 24th and 28th weeks of pregnancy and a gradual increase from this point until birth, returning to initial levels in approximately the 6th week postpartum.⁴⁻⁹ However, alterations in morphological erythrocyte indices and the nosological meaning of such alterations are not well established. The few studies published⁵⁻⁹ state that MCH and MCHC can also undergo significant drops in normal pregnancy, becoming accentuated by the end of the third trimester; and that the MCV undergoes an increase, following the same time sequence, however, do not deviate from ranges normal for healthy women at fertile ages and return to pre-pregnancy levels in the late puerperal period.^{5,8,9}

Current cutoff points of erythrocyte indices (during pregnancy as well) are derived from a survey carried out between the 1970s and 1990s on the North American population, therefore, likely do not apply to all populations.^{3,10,11} Consequently, it is of relevance to describe the behavior of these indices in different subpopulations, particularly during pregnancy, from the presupposition that they will be distributed in distinct manners.¹⁰ The aim of this study was to describe the distribution of RBC, HTC, Hb, MCV, MCH and MCHC in the second trimester of low-risk pregnant women and determine the correlation between haematocrit and hemoglobin concentration values.

Patients and Method

This cross-sectional study was based on a secondary databank of a clinical trial.¹² Between May 2000 and June 2001, pregnant women were recruited at the women's prenatal care clinic of the Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP), a tertiary care hospital located at sea level in northeastern Brazil. Subjects who had used medication containing iron in the previous 60 days were excluded. A total of 393 participants with a single, low-risk pregnancy between 16 and 20 weeks were selected. Of these subjects, 347 underwent the hematological examinations analyzed herein.

Erythrograms were performed by a automated electronic cells counter (model Coulter T 890) and included the following variables: RBC in 10^{12} cells per liter (10^{12} cel/L); Hb in grams of hemoglobin per deciliter of whole blood (g/dL); HTC in percentage of volume of whole blood occupied by the conglomerate of red blood cells (%); MCV in femtoliters (fL); MCH in picograms (pg) of hemoglobin per red blood cell; MCHC in grams of hemoglobin per deciliter of the conglomerate of red blood cells (g/dL).

Statistical analysis was performed using the EPI INFO 6.04 b and Minitab 14.2 software programs, obtaining frequency distribution, mean and standard

deviation. The Anderson-Darling test was used for the compatibility of the variables with Gaussian distribution. Pearson's test was used for the correlation between the HTC and Hb values. The Research Ethics Committee of the Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira approved the study under n° 650/05.

Results

The mass erythrocyte indices (RBC, HTC and Hb) were Gaussians. The same did not occur with the morphological erythrocyte indices (MCV, MCH and MCHC). Due to the large sample size and the proximity of the mean and median values, the option was made to represent them through means and standard deviations (Table 1). Figure 1 illustrates a linear correlation in which each additional unit of Hb corresponded to 2.94 units of HTC, beginning with a virtual minimum value of 1.23.

Table 1. Distribution of erythrocyte indices in 2nd trimester of pregnancy. Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil, 2000/2001

Parameter Índice	Average	+/- 2 SD	Normality test*
RBC	$3,7 \times 10^{12}/L$	$3,0 \times 10^{12} - 4,4 \times 10^{12}/L$	0,846
HTC	32,9%	27,5 - 38,4%	0,892
Hb	10,8 g/dL	9,0 - 12,6 g/dL	0,293
MCV	88,4 fL	78,6 - 98,2 fL	< 0,005
MCH	29,0 pg	25,1 - 32,8 pg	< 0,005
MCHC	32,8 g/dL	31,0 - 34,5 g/dL	0,032

RBC = red blood cells number; HTC = haematocrit; Hb = hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; SD = standard deviation.

* Anderson-Darling test

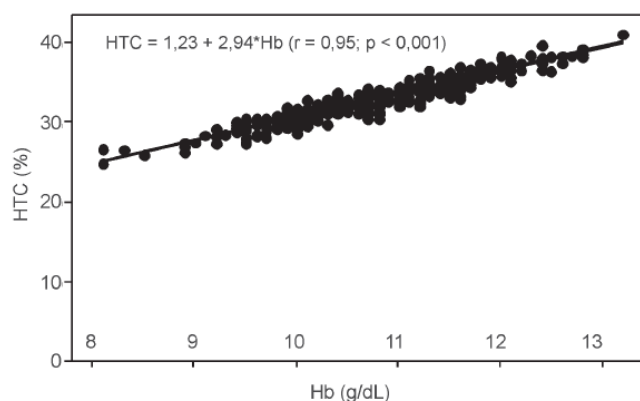


Figure 1. Correlation between hemoglobin concentration (Hb) and haematocrit (HTC) values in 2nd trimester of pregnancy. Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira (IMIP), Recife, Brazil. 2000/2001

Table 2. Studies that describe erythrocyte indices in the 2nd trimester of pregnancy. Medical Literature Analysis and Retrieval System Online (Medline), MDconsult, Scientific Electronic Library Online (SciELO), Literatura Latino-americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs) and Cochrane (1980-2007)

Authors (year) Country	Statistic	RBC ($\cdot 10^{12}$ cél/L)	HTC (%)	Hb (g/dL)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Puolakka (1980) ¹⁷ Finland	X ($\pm 2SD$)				90 (82-98)		32.7 (29.9-35.5)
Volpi et al. (1991) ¹⁸ Italia	X	4.06		11.5	89.6	28.6	31.9
Knight et al. (1994) ¹⁹ Afroamericanas	X (SD)	3.7 (0.1)	34.3 (0.5)	11.6 (0.1)	89.6 (0.7)	30.6 (0.3)	33.8 (0.3)
Petraglia et al. (1994) ⁴ Brazil	X (UL-LL)	3.75 (3.29-4.22)	34.8 (32-37.5)	11.0 (10.0-12.0)			
Van Buul et al. (1995) ⁸ Holland	X (p5-p95)	3.8 (3.3-4.4)	34.8 (32-37.5)		89 (82-97)		
Friis et al. (2001) ²⁰ Africa	X (CI)			11.8 (11.7-11.9)			
Casanova et al. (2005) ¹⁶ Afroamericanas	X (SD)				83.9 (1.0)	28.4 (0.4)	33.8 (1.0)

RBC = red blood cells number; HTC = haematocrit; Hb = hemoglobin concentration; MCV = mean corpuscular volume; MCH = mean corpuscular hemoglobin; MCHC = mean corpuscular hemoglobin concentration; X = mean; SD = standard deviation; UL-LL = upper limit - lower limit; p5-p95 = 5percentile - 95percentile. 95% confidence interval (CI).

Discussion

From the premise of Gaussian distribution¹³ regarding the specific case of anemia, 2.5 percent of the subjects would be below the lower threshold of normality for the red blood cells number, haematocrit and hemoglobina levels.¹⁰ The same criteria applies to the size of the red blood cells or their degree of hemoglobinization.¹² Hence, in an attempt to reproduce the actual distribution of erythrocyte indices in the present sample, data were analyzed without excluding iron deficiency and not all exhibited the expected Gaussian configuration.^{9,14,15} Erythrocyte mass indices (RBC, HTC and Hb) exhibited Normal distribution, whereas morphological indices (MCV, MCH and MCHC) did not follow a Normal curve. This phenomenon may be explained by a possible emergence of young red blood cells of different sizes and degrees of hemoglobinization, recruited by the high erythropoietic demand of pregnancy.¹⁶

As displayed in Table 2, studies^{4,8,16-20} describing erythrocyte indices values in the second trimester of pregnancy generally demonstrate that these values tend not to deviate from ranges considered normal for healthy women at fertile ages.¹⁰ This situation was not corroborated by the present study with regard to RBC, HTC and Hb, as the means of these values were below their respective lower cutoff points. This finding indicates an epidemiologically anemic population, considered to be of a severe magnitude by the World Health Organization ($\geq 40\%$).¹⁰ However, this high frequency could indicate an absolute (true anemia) and/or relative (hemodilution) drop in erythrocyte mass among these pregnant women.¹⁰ Indeed, an analyses of same databank verified that the frequency of anemia whereas the frequency of iron deficiency anemia were 56.6% and 10.7%,

respectively.²¹ Therefore, is necessary survey to establish the true erythrocyte indices cutoff points in pregnancy women at the our region.

Milman et al.⁵ demonstrated a significant correlation between HTC and Hb throughout pregnancy in patients treated both with and without iron. The resultant function ($HTC = 0.046 + 2.62 Hb$) was similar to that found here, reaffirming a 3:1 correlation empirically observed between the HTC and Hb cutoff points.^{10,11} Therefore, there may be incoherence in considering cutoff points that do not obey this rule, as when establishing a 11.0 g/dL threshold for Hb, this would signify a 33% threshold for HTC. Co-linearity could be applied by extension to the RBC and MCV, as these are derived from the HTC; to the MCH, as its is derived from the RBC, and to the MCHC, as it is derived from the Hb/HTC.¹²

Conclusions

In the second trimester of pregnancy, the erythrocyte mass indices routinely used in the diagnosis of anemia were, on average, lower than limits considered normal and reproduced Gaussian distribution. The morphological indices remained within ranges considered normal, but did not delineate a Normal curve. There was the expected co-linearity between HTC and Hb values at a ratio 3:1.

Resumo

Os valores dos índices eritrocitários comportam-se de maneira particular no ciclo grávido-puerperal, entretanto, o significado fisiológico ou nosológico de tais alterações não está bem estabelecido. Este estudo objetivou analisar as distribuições dos índices

eritrocitários no segundo trimestre da gestação. O estudo foi realizado baseando-se em dados secundários de 347 gestantes de 2º trimestre do pré-natal de baixo risco do Instituto Materno Infantil Prof. Fernando Figueira (Recife - Brasil), entre maio de 2000 e junho de 2001. Foram construídas curvas de distribuição de frequências dos índices eritrocitários, com médias e desvios-padrão, e curva de correlação dos valores de hematócrito (HTC) e de concentração de hemoglobina (Hb), mensurados por contador automático. O valor médio da hematimetria foi $3,7 \times 10^{12}$ células/L; do HTC, 32,9% e da Hb, 10,8 g/dL, apresentando distribuições gaussianas. As médias foram para volume corpuscular médio de 88,4 fL; hemoglobina corpuscular média de 29,0 pg e concentração de hemoglobina corpuscular média de 32,8 g/dL, não ajustadas à distribuição normal. Os valores de HTC corresponderam a três vezes os de Hb. Hematimetria, HTC e Hb – utilizados para diagnóstico de anemia – foram, em média, inferiores aos limites considerados normais, apresentando distribuições gaussianas. Os índices morfológicos mantiveram-se nas faixas consideradas normais, porém sem delinear curva Normal. O HTC e Hb apresentaram a correlação linear esperada. Rev. Bras. Hematol. Hemoter.

Palavras-chave: Anemia; anemia ferropriva; cuidado pré-natal; índices de eritrócitos; gravidez.

Acknowledgments

The authors are grateful to professor José Natal Figueiroa, MS (Postgraduate teaching staff member in Mother-Infant Health at Instituto Materno Infantil Professor Fernando Figueira [IMIP]) for the indispensable assistance in the statistics.

References

- Schrier SL. Excerpted from: approach to the adult patient with anemia. Available from: http://patients.uptodate.com/topic.asp?file=red_cell/2950. Accessed in 2008 (Jan 22).
- Guyton AC, Hall JE. Glóbulos vermelhos, anemia e policitemia. In: Guyton AC, Hall JE, editors. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1997. p. 389-96.
- Yip R. Significance of an abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition. Am J Clin Nutr. 2000 Jul;72(1 Suppl):272S-279S.
- Petraglia B, Silva LG, Rezende Filho J, Netto HC, Montenegro CA. Avaliação dos valores eritrocitários no ciclo grávido-puerperal [Normal values of erythrogram in pregnancy and puerperium]. J Bras Ginecol. 1994;104(5):139-44.
- Milman N, Byg KE, Agger AO. Hemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. Acta Obstet Gynecol Scand. 2000; 79(2):89-98.
- Bendell J, Benz Jr. EJ. Hematologic changes of pregnancy. In: Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors. Hematology: basic principles and practice. 4th ed. Florida: Churchill Livingstone; 2005. p. 2629-32.
- Samuels P. Hematologic complications of pregnancy. In: Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, editors. Obstetrics: normal and problem pregnancies. 5th ed. Florida: Churchill Livingstone; 2002. p. 1169-79.
- van Buul EJ, Steegers EA, Jongsma HW, Eskes TK, Thomas CM, Hein PR. Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study. Neth J Med. 1995;46(2):73-85.
- Tam KF, Lao TT. Hemoglobin and red cell indices correlated with serum ferritin concentration in late pregnancy. Obstet Gynecol. 1999;93(3):427-31.
- World Health Organization. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control. A guide for programme managers. Geneva, Switzerland: WHO, 2001. Available from: http://www.who.int/nutrition/publications/en/ida_assessment_prevention_control.pdf. Accessed in 2008 (Jan 9).
- Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR Recomm Rep. 1998;47(RR-3):1-29.
- Souza AI, Batista-Filho M, Ferreira LO, Figueiroa JN. Efetividade de três esquemas com sulfato ferroso para tratamento de anemia em gestantes [The effectiveness of three regimens using ferrous sulfate to treat anemia in pregnant women]. Rev Panam Salud Publica. 2004;15(5):313-9.
- Medronho RA, Perez MA. Testes diagnósticos. In: Medronho RA, Carvalho DM, Bloch KV, Luiz RR, Werneck GL, editors. Epidemiologia. São Paulo: Atheneu; 2005. p. 259-70.
- Lee EJ, Oh EJ, Park YJ, Lee HK, Kim BK. Soluble transferrin receptor (sTfR), ferritin, and sTfR/log ferritin index in anemic patients with nonhematologic malignancy and chronic inflammation. Clin Chem. 2002;48(7):1118-21.
- Cook JD, Flowers CH, Skikne BS. The quantitative assessment of body iron. Blood. 2003;101(9):3359-64.
- Casanova BF, Sammel MD, Macones GA. Development of a clinical prediction rule for iron deficiency anemia in pregnancy. Am J Obstet Gynecol. 2005;193(2):460-6.
- Puolakka J. Serum ferritin as a measure of iron stores during pregnancy. Acta Obstet Gynecol Scand Suppl. 1980;95:1-31.
- Volpi E, De Grandis T, Alba E, Mangione M, Dall'Amico D, Bollati C. Variazione dei livelli di ferritinemia nella gravidanza fisiologica [Variations in ferritin levels in blood during physiological pregnancy]. Minerva Ginecol. 1991;43(9):387-91.
- Knight EM, Spurlock BG, Edwards CH, Johnson AA, Oyemade UJ, Cole OJ, et al. Biochemical profile of African American women during three trimesters of pregnancy and at delivery. J Nutr. 1994;124(6 Suppl):943S-953S.
- Friis H, Gomo E, Koestel P, Ndhlovu P, Nyazema N, Krarup H, et al. HIV and other predictors of serum folate, serum ferritin, and hemoglobin in pregnancy: a cross-sectional study in Zimbabwe. Am J Clin Nutr. 2001;73(6):1066-73.
- Bresani CC, Souza AI, Batista-Filho M, Figueiroa JN. Anemia e ferropenia em gestantes: dissensos de resultados de um estudo transversal. Rev Bras Saúde Matern Infant. 2007;7(Supl.1): S15-S22.

Avaliação: Editor e dois revisores externos
Conflito de interesse: não declarado

Recebido: 18/06/2008
Aceito: 28/07/2008

Valores normais do eritrograma na gravidez

Normal values of erythrocyte indices in pregnancy

Ivan L. Angulo

A expansão do volume plasmático é a principal alteração hematológica na gravidez normal, alcançando valores de 40% a 60%.¹ Ao mesmo tempo ocorre aumento da massa eritrocitária em intensidade menor, devido à aceleração da eritropoiese pela maior concentração de eritropoietina no segundo e terceiro trimestres.² O resultado é a manutenção de valores do hematócrito entre 30% e 32%.¹ Essas alterações fisiológicas parecem ser benéficas, contrabalançando pela menor viscosidade sanguínea um estado de hipercoagulabilidade.

Os valores considerados normais são, portanto, diferentes da população feminina não grávida³ e podem variar conforme a composição étnica e fatores ambientais em países diferentes.⁴ No caso do Brasil, fica evidente a impossibilidade de se aplicarem valores estabelecidos para países europeus ou da América do Norte.⁵ Esta preocupação já se manifesta em autores brasileiros desde os anos 70 até hoje.^{6,7} A esses estudos vem juntar-se com muita competência o de Bresani e col⁸ sobre os valores dos índices eritrocitários nas grávidas do Recife, Pernambuco, utilizando um tratamento estatístico adequado a uma grande casuística, o que o torna um estudo representativo da realidade local.

Estudos dessa magnitude são fundamentais e necessários para o diagnóstico correto, e, conseqüentemente, tratamento adequado da anemia na gravidez, flagelo que chega a acometer, segundo a Organização Mundial da Saúde, 35% a 75% das gestantes em países em desenvolvimento, como o nosso. Infelizmente não há dados do Ministério da Saúde do Brasil. A anemia prejudica a saúde da mãe e do feto, causando abortamento e baixo peso ao nascer.¹ A avaliação da saúde da gestante precisa de testes laboratoriais sensíveis e específicos. Os desvios da normalidade devem ser investigados e as causas eliminadas para que se complete com harmonia o período gravídico, culminando com concepção saudável para ambos, mãe e filho.

Referências Bibliográficas

1. Bendell J, Bentz Jr EJ: Hematologic changes of pregnancy. In Hoffman R, Benz Jr EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, Silberstein LE, Mc Glave P (ed). Hematology - Basic Principles and Practice. 2005, Elsevier, Philadelphia, pp. 2629-2640.
2. McMullin MF, White R, Lappin T, Reeves J, MacKenzie G. Hemoglobin during pregnancy: relationship to erythropoietin and hematinic status. Eur J Haematol. 2003;71:44-50.
3. Lewis SM. Reference ranges and normal values. In Lewis SM, Bain BJ, Bates I (ed). In Dacie and Lewis. Practical Haematology. 2006, Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 11-24.

4. James TR, Reid HL, Mullings AM. Are published standards for haematological indices in pregnancy applicable across populations: an evaluation in healthy pregnant Jamaican women. BMC Pregnancy Childbirth; 2008, 8:8.
5. CDC criteria for anemia in children and childbearing-aged women. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 1989;38:400.
6. Almeida PAM, Ciari Jr C, Santos JLF, Siqueira AAF. Curva de hemoglobina em um grupo de gestantes normais. Rev Saúde Pública. 1973;7(3):273-82.
7. Nascimento MLP. A hemodiluição da gestação e os indicadores para anemias após automação hematológica. NewsLab, 2005;71:136-160.
8. Bresani CC, Souza AI, Batista Filho M. Erythrocyte indices in the second trimester of pregnancy: are reference values well established? Rev. Bras. Hematol. Hemoter. 2009;31(1):37-40.

Avaliação: O tema abordado foi sugerido e avaliado pelo editor.

Recebido: 18/01/2009

Aceito: 19/01/2009

Assessor médico da Fundação Hemocentro.
Centro Regional de Hematologia e Hemoterapia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, SP.

Correspondência: Ivan de Lucena Angulo
Rua Ten. Catão Roxo, 2501 – Monte Alegre
14051-140 – Ribeirão Preto-SP – Brasil
Tel.: (+55 16) 2101-9300 ramal 9515

4.2 Artigo II - Utilidade da hemoglobina para diagnosticar a deficiência de ferro e para avaliar a eficácia da ferroterapia em gestantes: reanálise de um ensaio clínico 10 anos depois, considerando os valores iniciais de ferritina sérica e os escores Z de hemoglobina

Haemoglobin utility to diagnose the iron-deficiency and evaluate iron-therapy efficacy in pregnant women: a 10 years later clinical trial reanalysis using initial ferritin values and the haemoglobin Z-scores

Instituição: Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP)

Autores:

Cristiane C Bresani¹ (autor para correspondência)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550

Telefone/Fax: (+55) (81)21224781 / (+55) (81)21224722

e-mail: cristiane.bresani@inss.gov.br

Maria C Braga^{2,3} - braga@cpqam.Fiocruz.br

Malaquias Batista-Filho^{1,2} - malaquias.imip@gmail.com

¹Grupo de Pesquisas em Nutrição do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ²Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-infantil do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ³Programa de Pós-graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz – CPQAM/FIOCRUZ (Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE Brasil | CEP: 50.670-420).

Abstract

Background: the control of the iron-deficiency maternal anaemia remains a worldwide health problem throughout the centuries. Most of the clinical trials and health policy are based on the measurement of haemoglobin concentration (Hb) to guide the interventions with iron supplements. However, the diagnostic accuracy of Hb is poor, as well as the accuracy of the others erythrocyte indices. Furthermore, the haemodilution phenomenon could bias the evaluation of therapeutic efficacy by the follow up of Hb values through the gestational weeks. **Methods/design:** the objective of this study was to evaluate the Hb accuracy for iron-deficiency diagnosis in pregnancy; and to analyze the efficacy of oral iron-therapy regarding the pretreatment iron stores (serum ferritin) and the gestational week (Hb Z-score) in a clinical trial databank conducted in a prenatal care center in the Northeast of Brazil. Among 347 women in the second trimester of low-risk pregnancy screened for the study, 150 had anaemia (Hb < 11.0 g/dL) and were included in the trial. Among the screened pregnant women, 318 had their serum ferritin results, such as the sensitivity, specificity, predictive values of Hb (< 11.0 g/dL) and its Receiver Operating Characteristic (ROC) curve were determined against serum ferritin pretreatment (SF < 12.0 ng/mL). Among the 150 anemic women recruited for the treatments, 140 had their serum ferritin results and were included in the therapeutic efficacy re-analysis in the three trial's intervention groups with 60 mg of oral iron: weekly (n 37), twice a week (n 43) or daily (n 37). So the mean differences (MD) between post and pretreatment Hb values (g/dL) and post and pretreatment Hb Z-scores (standard deviation-SD) were estimated in with and without iron-deficiency strata (SF < 12.0 ng/mL) in each treatment group. **Results:** sensitivity, specificity and area under ROC-curve of Hb were 60.7% (95% CI 46.8;73.5), 44.3% (95% CI 38.2;50.5) and 0.54 (95% CI 0.46;0.63). Women without iron-deficiency (largest stratum) showed absolute MD of Hb resembling the overall results of the primary study: weekly = 0.20 g/dL (95% CI -0.12;0.53); twice a week = 0.64 g/dL (95% CI 0.39;0.90); daily = 0.75 g/dL (95% CI 0.51;0.98). However, this stratum did not achieve improvement in their Hb Z-scores: weekly = -0.6 SD (95% CI -0.99;-0.28); twice a week = -0.2 SD (95% CI -0.47;0.08); daily = -0.1 SD (95% CI -0.33;0.18). On the other hand, women with iron-deficiency treated with intermittent schemes had reduction in their Hb and Hb Z-scores: weekly = -0.42 g/dL (95% CI -0.72;-0.12) and -1.4 SD (95% CI -1.74;-0.99); twice a week = -0.14 g/dL (95% CI -0.46;0.17) and -1.1 SD (95% CI -1.44;-0.75). **Conclusions:** the use of Hb as the unique diagnostic criterion can induce non-treat iron-deficient women or treat pregnant women without functional iron deficiency. So it is recommended to perform the adjustment of Hb values in relation to the gestational age and measure iron biomarkers to evaluate the iron needs during pregnancy.

Key words: 1) Iron-Deficiency Anemia / diagnosis, 2) Pregnancy, 3) Erythrocyte Indices, 4) Clinical Trial.

Background

Recent estimates show that maternal anaemia is still present in high prevalence worldwide (50%) and in Americas (20%) [1,2]. Anaemia during pregnancy has been associated with several adverse perinatal outcomes, such as prematurity, low birth weight and maternal and perinatal mortalities [1-9], which was implicated in 56% of 800,000 deaths attributed to anaemia in 2000 [2]. Since the 80's, iron supplementation during pregnancy has been widely recommended as a health policy to control anaemia [10,11] under the assumption that low haemoglobin concentrations ($Hb < 11.0$ g/dL) would be a *proxy* of iron-deficiency anaemia [11]. However, several studies have shown that the anaemia has multiple causes during pregnancy and the erythrocyte indices, particularly the Hb, have low diagnostic accuracy for the maternal iron-deficiency [12-18]. This matter favors diagnostic misclassification in the election of patients to receive iron therapy, so the widespread use of Hb criterion could explain in part the control programs failure [1,11,19], as well as the low efficacy of iron-therapy in clinical trials [20,21,22]. Although, serum ferritin has been the most accurate biomarker to iron-deficiency diagnosis in pregnant women [18,22,23] it is underutilized in clinical trials study designs of iron-therapy in pregnancy [20,21].

Moreover, physiological fluctuations in Hb values could bias the measurement of the therapeutic efficacy during therapeutic follow-ups in pregnancy. The homeostatic haemodilution during pregnancy leads a physiological curve of Hb and haematocrit levels [12-18], which takes on an U-shaped distribution with nadir between the 24th and 28th gestational weeks [9,23-27]. Considering this phenomenon, Beaton and McCabe (1999) proposed the use of Z-score to adjust the measurement of Hb during pregnancy [21]. This methodology quantifies the difference (in standard deviation units) between an observed Hb value and the reference mean at the same gestational week, according to the distribution curve of Hb values of iron-supplemented healthy women from Europe and North-America [28]. These authors employed the Z-score to reanalyze the therapeutic efficacy on the Hb levels of 21 trials with oral iron in children and pregnant women [21]. Their results on therapeutic efficacy by Hb Z-scores were striking different than the therapeutic effects presented in the primary trials whose outcomes were measured by Hb absolute values [21].

Although the Hb Z-score could be more adequate to surpass the haemodilution distortion on Hb values, clinical trials don't use it to compare iron treatments [20,21]. In most recent meta-analysis on maternal iron-deficiency anemia treatments [20], two authors,

Mumtaz *et al* [29] and Souza *et al* [30] compared the daily and intermittent schemes of oral iron. The study conducted by Mumtaz *et al* (2000) was the only one to apply Hb Z-scores among 23 clinical trials reviewed [20], and found results supporting the daily posology [29]. On the other hand, Souza *et al* (2004) trial used the absolute levels of Hb (< 11.0 g/dL) as the criterion to indicate iron treatment and to evaluate its therapeutic efficacy, finding results disagreeing with Mumtaz *et al* [29,30] and Beaton and McCabe [21] studies.

Thus, Souza *et al* [30] databank was reanalyzed through cross-sectional and prospective designs in order to explore the diagnostic utility of Hb measurements for indication and assessment of oral iron therapeutic efficacy in pregnant women, respectively. The aims of this study was to examine the accuracy of Hb against serum ferritin (SF) pretreatment values for iron-deficiency diagnosis in the screened population for the trial, and to reanalyze the therapeutic efficacy of oral iron schemes between two strata of SF pretreatment levels and applying Hb Z-scores for the outcome measurements. This methodological rationale guided the design to a recent clinical trial on maternal iron-deficiency diagnosis, set at the same prenatal service [31].

Experimental methods

The study protocol

The diagnostic validation analysis was performed using the data from 318 pregnant women recruited for the clinical trial conducted in 2001 by Souza *et al* (2004) at a prenatal care center in an urban city in the Northeast of Brazil [30]. Among 140 anemic women enrolled for the iron-therapies trial, a treatment efficacy reanalysis was undertaken introducing two new variables: the serum ferritin pre-treatment values and the adjustment of pre and post-treatment Hb values, according to the gestational week by the Z-score. The full protocol is available elsewhere [30], as well as the data concerning the therapeutic compliance and adverse effects [32].

Out of 347 women recruited with low-risk pregnancy, 180 had Hb < 11.0 g/dL, demonstrated prevalence 55% of anaemia according to this World Health Organization (WHO) criterion [11]. The median age was 22 years and the mean gestational age was 17 weeks at diagnosis. One-hundred and fifty anemic women agreed to participate and were randomly allocated into three treatment groups with different schemes of ferrous sulphate pills (60 mg of elementary iron) without supplementation of other micronutrient: group 1 –

one pill weekly (n 48); group 2 – one pill twice a week (n 53); group 3 – one pill daily (n 49). The women were treated during 16 (\pm 1) weeks and submitted to Hb measurements at the enrollment and at 8th and 16th weeks of the follow-up [30].

The red blood cell count was taken with an automated cell counter, *CoulterT890*[®] and serum ferritin (SF) was measured before treatment by Cobas[®] *Core Ferritin EIA* method from Roche[®] laboratory, a measurement zone between zero and 1200 ng/mL. This method is calibrated according to WHO international standards (IS 80/602) from the National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC).

Evaluation of Hb accuracy against serum ferritin

Among the 347 recruited pregnant women, 318 had serum ferritin pretreatment results available for this analysis, which was a sufficient number to estimate a sensitivity of 90% (\pm 9%) and specificity of 80% (\pm 8%), with a relative error of 10%, assuming a 50% frequency for iron-deficiency anaemia in the study population [2,30]. The agreement (kappa test), sensitivity, specificity and predictive values of Hb pretreatment according to WHO's cutoff point (Hb < 11.0 g/dL) were estimated against serum ferritin pretreatment as a gold-standard for the iron-deficiency diagnosis. Serum ferritin values under 12.0 ng/mL were classified as *iron-deficiency* according to the WHO recommendations and Disease Control and Prevention Centers (CDC) [11,28].

The discriminatory power of Hb was verified by the Receiver Operating Characteristic (ROC) curve and was represented by the area under the curve (AUC). The ROC curve plots the correlation between sensitivity and 1-specificity in all test values observed in the population distribution and enables to evaluate the discriminatory power test and to choose its most accurate cutoff point [33]. In general terms, distinctions could be made between non-informative (AUC = 0.5), less accurate ($0.5 > \text{AUC} \leq 0.7$), moderately accurate ($0.7 > \text{AUC} \leq 0.9$), highly accurate ($0.9 > \text{AUC} < 1.0$) and perfect tests (AUC = 1.0) [33]. A perfect test would achieve both sensitivity and specificity of 100% at one possible cutoff point [33].

Evaluation of therapeutic efficacy using pretreatment serum ferritin stratification and Hb Z-scores

The therapeutic efficacy reanalysis in each treatment group was taken according to the serum ferritin pretreatment strata (< 12.0 ng/mL or \geq 12.0 ng/mL) and applying the Hb Z-scores to measure the increase of Hb. This analysis was performed on 140 pregnant women with initial results of serum ferritin (SF) among the 150 women enrolled in the trial. The mean

differences (MD) between Hb post and pretreatment absolute values and between Hb Z-scores post and pretreatment were estimated in each treatment group stratified according to SF. The Hb Z-scores were obtained from each woman according to the curve proposed by Beaton and McCabe [21]. Along this curve the Hb standard deviation must be 0.9 g/dL at any gestational age. The Z-score is calculated according to the following equation: $Z\text{-score} = (\text{Hb observed} - \text{Hb expected mean}) / \text{SD (reference population)}$. So, each Z-score unit corresponds to one standard deviation (SD) from the Hb mean [21].

The Student's t-test (two-sided significance) was used to assess the therapeutic response differences between strata in each treatment groups, with the significance level set at 5%. Data was analyzed on EPIINFO 6.04b, Minitab 14.2 and Stata 9.2 software programs. The study followed the Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects (Declaration of Helsinki) and the reanalysis received an approval from IMIP Ethics Committee (number 650/2005). Written informed consent was obtained from all the patients before the admission on the trial.

Results

Hb accuracy against serum ferritin

Table 1 shows the distribution of the Hb criterion results (< 11.0 g/dL) against the gold-standard serum ferritin for iron-deficiency diagnosis (SF < 12.0 ng/mL). The frequency of iron-deficiency estimated by Hb criterion was 57% while the estimated SF was 18%. Among pregnant women classified as anemic by the Hb criterion, 81% (146/180) had body iron stores (SF \geq 12.0 ng/mL). Diagnostic agreement between both tests occurred in 10.7 % of the cases (Cohen's Kappa = 0.027; 95% CI -0.050;0.103). Based on the results in Table 1, the accuracy parameters were estimated. The Hb criterion showed sensitivity of 60.7% (95% CI 46.8;73.5), specificity of 44.3% (95% CI 38.2;50.5), accuracy of 47.2% (95% CI 41.7;52.7), positive predictive value of 18.9% (95% CI 13.5;25.4) and negative predictive value of 84.1% (95% CI 76.9;89.7). The ROC-curve of Hb was less accurate for iron deficiency diagnosis: AUC = 0.54; 95% CI 0.46;0.63 (Figure 1).

Therapeutic efficacy using SF pretreatment stratification and Hb Z-scores

Table 2 and 3 show, respectively, an overall and stratified therapeutic responses assessed by Hb absolute values and Hb Z-scores in each treatment group. The overall difference means in

absolute values of Hb indicated positive effects with twice a week and daily treatments, but the results in Z-scores were negative after all treatment schemes. When the Hb absolute values were used to evaluate the therapeutic response after stratifying the treatment groups according to the SF pretreatment values, the results obtained in the stratum with SF ≥ 12.0 ng/mL (largest representative sample) were positively similar to those obtained in the primary overall analysis by the Hb absolute values [30]. However, the stratum with SF < 12.0 ng/mL showed inversion of the effect in the groups who underwent intermittent treatments (weekly and twice a week). The effects of iron treatments evaluated by Hb Z-scores showed negative means in both strata. Briefly, the shaded cells in Table 3 show that only the women treated with daily doses or women with a stored iron baseline (SF ≥ 12 ng/mL) treated at least twice a week achieved positive effects in their Hb values (shaded cells in the second column) and maintained their Hb Z-scores (shaded cells in the third column).

Table 1. Distribution of haemoglobin and serum ferritin results in 318 women at the 2nd trimester of pregnancy.

Haemoglobin level (g/dL)	Iron deficiency (serum ferritin)		Total
	Present (< 12.0 ng/mL)	Absent (≥ 12.0 ng/mL)	
Low (< 11.0 g/dL)	34 (10.7 %)	146 (45.9 %)	180 (56.6 %)
Normal (≥ 11.0 g/dL)	22 (6.9 %)	116 (36.5 %)	138 (43.4 %)
Total	56 (17.6 %)	262 (82.4 %)	318 (100 %)

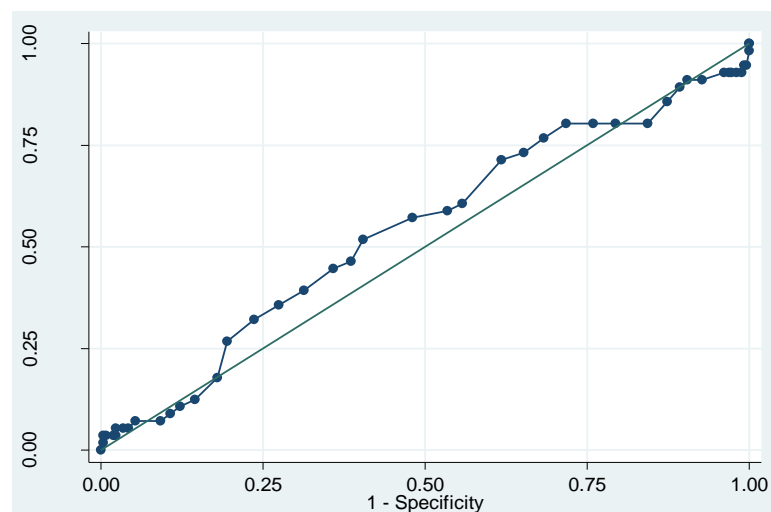


Figure 1. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve for haemoglobin concentration to diagnose iron-deficiency in 318 women at their 2nd trimester of pregnancy.

Table 2. Comparison of the overall therapeutic response in each treatment group, by the mean differences between post and pre-treatment haemoglobin values (Hb) and by Hb Z-scores.

<u>Treatment group</u>	Overall therapeutic response in Hb va lues*			Stratified therapeutic response according to serum ferritin levels		
	N	Hb MD (CI)	<i>p</i> [†]	n	Z-score Hb MD (CI)	<i>p</i> [†]
1- Weekly	48	0.1 g/dL (-0.14;0.42)	0.314	48	-0.71 SD (-1.02;-0.40)	< 0.001
2- Twice a week	53	0.5 g/dL (0.30;0.74)	<0.001	53	-0.33 SD (-0.57;-0.09)	0.008
3- Daily	49	0.9 g/dL (0.64;1.08)	<0.001	49	0.057 SD (-0.19;0.30)	0.643

MD: mean difference | CI: 95% confidence interval | SD: standard deviation

* Primary results published previously by Souza *et al* (2004).

[†] Student's t test for the tow-sided significance level to compare between the two strata in each treatment group.

Table 3. Comparison of therapeutic response between strata with and without iron-deficiency (serum ferritin < 12 ng/mL) in each treatment group, by the mean differences between post and pre-treatment haemoglobin values (Hb) and by Hb Z-scores. (Results of the re-analysis after excluding 10 observations without serum ferritin data)

<u>Treatment group</u>	Stratified therapeutic response according to serum ferritin levels (n=140)**										
	SF < 12 ng/mL					SF ≥ 12 ng/mL					
	n	Hb MD (CI)	<i>p</i> [†]	n	Hb MD (CI)	n	Z-score Hb MD (CI)	<i>p</i> [†]	n	Z-score Hb MD (CI)	<i>p</i> [†]
1- Weekly	9	-0.42 g/dL (-0.72;-0.12)	0.066	37	0.20 g/dL (-0.12;0.53)	9	-1.4 SD (-1.74;-0.99)	0.051	37	-0.6 SD (-0.99;-0.28)	0.051
2- Twice a week	7	-0.14 g/dL (-0.46;0.17)	0.017	43	0.64 g/dL (0.39;0.90)	7	-1.1 SD (-1.44;-0.75)	0.012	43	-0.2 SD (-0.47;0.08)	0.012
3- Daily	7	1.5 g/dL (0.49;2.51)	0.023	37	0.75 g/dL (0.51;0.98)	7	0.8 SD (-0.35;1.94)	0.016	37	-0.1 SD (-0.33;0.18)	0.016

SF: serum ferritin | MD: mean difference | CI: 95% confidence interval | SD: standard deviation

□ The shaded cells in the table show that only the women treated with daily doses or women with an iron store baseline (SF ≥ 12 ng/mL) treated with twice a week or daily doses achieved positive effects in their Hb values (shaded cells in the second column) and maintained their Hb Z-scores (shaded cells in the third column).

[†] Student's t-test for the tow-sided significance level of MD in each treatment group

Discussion

These results confirm the low accuracy of Hb for iron-deficiency diagnosis in relation to the serum ferritin in the population and the lack of comparability between both diagnostic tests as shown by the low diagnosis agreement [34]. Moreover, the ROC curve indicated the low discriminatory power of Hb to iron-deficiency diagnosis, since it showed a near linear and symmetric correlation between the sensitivity (Se) and the specificity complement (1-Sp), as its AUC shows it is not possible to achieve both Se and Sp above 50% at any Hb cutoff point in those pregnant women [33]. The diagnostic accuracy of other erythrocyte indices in this study population was tested (not shown results) and was found that the AUC of each test (red blood cells count, haematocrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration) was between 0.45 (red blood cells count) and 0.65 (mean corpuscular volume) [35]. These results are in accordance with previous validation studies of erythrocyte indices against serum ferritin in pregnant women. Tam *et al* (1999) and Casanova *et al* (2005) have found moderate accurate ROC curves with AUC around 0.7 for all erythrocyte indices and low Se of Hb during pregnancy, 64% ($Hb \leq 11.0$ g/dL) and 43% ($Hb \leq 9.6$ g/dL) [12,17].

Low levels of Hb have been considered as a *proxy* of iron-deficiency anaemia in the population surveys [11], and have been proposed as screening test to detect iron-deficiency anaemia in pregnant women under the assumption of high sensitivity [11]. However, evidences point towards the inadequacy of using Hb absolute values as unique and invariable diagnosis criterion during pregnancy [12,13,17,18]. The results of this study showed that almost 40% of the women with deficient body iron ($SF < 12.0$ ng/mL) were not selected to receive iron-therapies because they had normal Hb (22/56 in Table 1) and only 16% (23/140 in Table 3) of the women underwent to treatments had iron-deficiency anaemia [11,23,28]. These potential sources of diagnostic misclassification may be contributing to low cure rates (approximately 50%) found in the primary analyzes by Souza *et al* [30] and could explain similar findings in others therapeutic trials with oral iron in pregnancy [20,21]. Beyond this, the increase in Hb levels after iron-therapy, despite it is considered the most reliable indicator of iron-deficiency in the general population [11,23,36] is prone to distortions during pregnancy due to the haemodilution phenomenon [21].

Thus, when the Hb values are adjusted for its physiological curve by Z-scores, the therapeutic effects can be even worse than often shown by primary trials reports, as observed

in Beaton and McCabe's metanalysis [21]. Therefore, to understand this issue better, the data from the therapeutic trial conducted by Souza *et al* [30] were retrospectively analyzed considering body iron stores pretreatment and adjusting the Hb values for the gestational week. Indeed, our demonstration of poor accuracy of Hb as the criterion to select patients for the trial's interventions was coherent with the worst therapeutic response disclosed in our analysis. The similarity between the positive effects of twice a week and the daily posology observed by the primary analyses [30] was not observed in these secondary analyses, suggesting a detrimental effect in pregnant women who underwent intermittent treatment schemes. Particularly in the iron-deficient stratum, the results seem to have opposite effect direction and could go against oral iron intermittent schemes if the sample size would be adequate. These findings agreed with the analyses by Beaton and McCabe [21], as well as with the trial conducted by Mumtaz *et al* [29], which demonstrated greater daily therapeutic efficacy than intermittent oral iron doses while using the Hb Z-score methodology to evaluate the outcomes. Moreover, Beaton and McCabe [21] demonstrated that the haemodilution phenomenon can interfere with inter-study comparability, but our findings indicate that it may also affect the comparison between different treatments within the same study (intra-study comparability).

Actually, our most striking finding was the negative or neutral effect of all therapeutic schemes after adjusting the Hb values according to the gestational week by the Z-score method. These seemingly dissent results may reflect distortions from the haemodilution on the longitudinal observation of Hb values during the follow-up period between the indication and the assessment of the outcomes. The mean of the participants' gestational age at the time of enrollment in the trial was 17 weeks and women were followed during 16 weeks [30], a period that coincides with the ascendant loop of the Hb physiological curve during pregnancy [21-27]. Hence, the positive primary findings in Hb absolute values could largely mean a physiological effect, since the sample was represented mostly by women without iron-deficiency who showed a non-increase of Hb Z-scores when undergoing a twice a week or daily treatment. In addition, failures of these women to improve the Hb Z-score *status* can indicate the presence of other causes of anemia beyond the "physiological anaemia", such as infections and other nutritional deficiencies.

A counterpoint to these interpretations is the maintenance of the increasing magnitude of the effects across the increasing posology of iron-therapy, both in absolute values as in Z-scores of Hb. Two limitations of this study might be related to this observation. Firstly, the cutoff point of serum ferritin adopted in the stratification (12.0 ng/mL) is based on the

population distributions [11,28]. There is insufficient evidence to establish the most accurate cutoff point of serum ferritin to discriminate iron-deficient and iron-sufficient pregnant women as only two studies compared serum ferritin values to iron contents in pregnant women bone marrow. The first happened before the WHO's standardization for the human ferritins for immunoassays in 1985 [14]. After that van den Broek *et al* showed 90% of sensitivity and 85% of specificity at cutoff point of serum ferritin less than 30 ng/mL for iron-deficiency diagnosis, but 34% of sensitivity and 93.7% specificity at a cutoff point of 12.0 ng/mL [13]. Therefore our analyses were performed again using the cutoff point of 30.0 ng/mL (not shown results) but the therapeutic effects were not modified. Actually, there can be some level of functional iron-deficiency in most of the studied pregnant women which could make them somehow iron-responsive disregarding serum ferritin strata. Moreover the Z-score of Hb had been calculated using a reference curve representative of North American and European pregnant women [21,28], whose Hb physiological curves may be different from the Brazilian population. In our population there may be a curve at a lower basal level of Hb. The use of a control arm in the clinical trial could help to control this local factor, but the primary study cannot.

Additional points suited to criticize are the low number of pregnant women with SF < 12.0 ng/mL that may have affected the precision of results in this stratum and the long period between the completion of the trial and this current analysis. However, it is worthwhile to emphasize the main aim of this study was to investigate interpretation distortions on oral iron therapeutic efficacy in anemic pregnant women when using Hb absolute values as diagnostic or curative criteria. This matter may threaten the internal validity of any study data irrespective of temporal factors which demonstrates the contemporaneity of the topic. However, studies for validation of iron biomarkers and diagnosis methods in pregnancy regarding natural Hb behavior and iron kinetics continue relevant and promising fields to investigate.

Conclusions

In summary, the use of Hb as the unique diagnostic criterion can induce non-treat iron-deficient women or treat pregnant women without functional iron deficiency, and consequently, it can preclude the expected iron-therapy response. Furthermore, the assessment of iron-therapy response guided by Hb might lead to distortions. So it is recommended to

perform the adjustment of Hb values in relation to the gestational age and adopt iron metabolism biomarkers, both at the moment of recommending iron-therapy as in the evaluations of response to population or individual iron-therapy during pregnancy.

Authors' contribution

The conception and design of the study were developed by Cristiane C Bresani. Dr. Maria C Braga, Dr. Malaquias Batista-Filho and Cristiane C Bresani performed the data analysis, the interpretation on the results and writing of the manuscript.

Competing interests

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial or not-for-profit sectors. The authors declare that they have no financial interests, as well as other potential conflicts of interest.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Ariani Impieri de Souza and Dr. José Natal Figueirôa for they have permitted the use of the trial databank conducted along with Dr. Malaquias Batista Filho, and for their contribution in these data analysis.

References

1. World Health Organization (2008). *Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia*. Geneva: WHO.
http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
2. Stoltzfus RJ (2003) *Iron deficiency: global prevalence and consequences*. *Food Nutr Bull* **24**, Suppl. 4, S99-S103.
3. Rasmussen KM (2001) *Iron deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Is there a causal relationship between iron deficiency or iron-deficiency anemia and weight at birth, length of gestation and perinatal mortality?* *J Nutr* **131**, S590-S603.
4. Steer P, Alam MA, Wadsworth J *et al.* (1995) *Relation between maternal haemoglobin concentration and birth weight in different ethnic groups*. *Br Med J* **310**, 489-491.
5. Allen LH (2000) *Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome*. *Am J Clin Nutr* **71**, S1280-S1284.
6. Murphy JF, Newcombe RG, O'Riordan J *et al.* (1986) *Relation of haemoglobin levels in first and second trimesters to outcome of pregnancy*. *Lancet* **327**, 992-995.

7. Cogswell ME, Parvanta I, Ickes L *et al.* (2003) *Iron supplementation during pregnancy, anemia, and birth weight: a randomized controlled trial.* *Am J Clin Nutr* **78**, 773-781.
8. Scholl TO, Reilly T (2000) *Anemia, iron and pregnancy outcome.* *J Nutr* **130**, S443-S447.
9. Yip R (2000) *Significance of an abnormally low or high haemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition.* *Am J Clin Nutr* **72**, S272-S279.
10. World Health Organization (1975) *Control of nutritional anaemia with special reference to iron deficiency.* WHO Technical Report Series no. 580. Geneva: WHO.
http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_580.pdf
11. World Health Organization (2001) *Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control – a guide for programme managers.* Geneva: WHO.
http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/index.html
12. Tam KF, Lao TT (1999) *Haemoglobin and red cell indices correlated with serum ferritin concentration in late pregnancy.* *Obstet Gynecol* **93**, 427-431.
13. van den Broek NR, Letsky EA, White AS *et al.* (1998) *Iron status in pregnant women: which measurements are valid?* *Br J Haematol* **103**, 817-824.
14. Puolakka J, Jänne O, Pakarinen A *et al.* (1980) *Serum ferritin in the diagnosis of anemia during pregnancy.* *Acta Obstet Gynecol Scand* **95**, S57-S63.
15. Thompson WG (1988) *Comparison of tests for diagnosis of iron depletion in pregnancy.* *Am J Obstet Gynecol* **159**, 1132-1134.
16. Volpi E, De Grandis T, Alba E *et al.* (1991). *Variations in ferritin levels in blood during physiological pregnancy.* *Minerva Ginecol* **43**, 387-391.
17. Casanova BF, Sammel MD, Macones GA (2005) *Development of a clinical prediction rule for iron deficiency anemia in pregnancy.* *Am J Obstet Gynecol* **193**, 460-466.
18. Milman N, Byg KE, Agger AO (2000) *Haemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation.* *Acta Obstet Gynecol Scand* **79**, 89-98.
19. United Nations Children's Fund/World Health Organization (1999) *Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children.* Geneva: UNICEF/WHO.
http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/U

[NICEF WHO ida consulation report.pdf](#)

20. Reveiz L, Gyte GML, Cuervo LG *et al.* (2012) *Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy. Cochrane Database of Systematic Reviews*, issue 10, CD003094.
<http://cochrane.bvsalud.org/cochrane/main.php?lib=COC&searchExp=anemia%20and%20gravidez%20and%20tratamento&lang=pt>
21. Beaton GH, McCabe GP (editors) (1999) *Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anemia in developing countries: an analysis of experience. Final report to the Micronutrient Initiative / Canadian International Development Agency.* Canada: MI/CIDA. <http://idl-bnc.idrc.ca/dspace/bitstream/10625/29662/3/117067.pdf>
22. Mei Z, Gogswell ME, Parvanta I *et al.* (2005) *Haemoglobin and ferritin are currently the most efficient indicators of population response to iron intervention: an analysis of nine randomized controlled trails. J Nutr* **135**, 1974-1980.
23. Milman N (2006) *Iron and pregnancy – a delicate balance. Ann Hematol* **85**, 559-565.
24. Petraglia B, Silva LGP da, Rezende Filho J de *et al.* (1994) *Avaliação dos valores eritrocitários no ciclo grávido-puerperal. J Bras Ginecol* **1014**, 139-144.
25. Bendell J, Benz Jr EJ (2005) Hematologic changes of pregnancy. In *Hematology: basic principles and practice*, 4th ed., pp 2629-2632 [Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, editors]. Florida, USA: Churchill Livingstone.
26. Samuels P (2002) Hematologic complications of pregnancy. In *Obstetrics: normal and problem pregnancies*, 5th ed., pp 1169-1179 [Gabbe SG, Niebyl JR, Simpson JL, editors]. Florida, USA: Churchill Livingstone.
27. van Buul EJ, Steegers EA, Jongsma HW *et al.* (1995) *Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study. Neth J Med* **46**, 73-85.
28. Centers for Disease Control and Prevention: Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR Recomm Rep* 1998, 47(RR-3):1–36.
29. Mumtaz Z, Shahab S, Butt N, *et al.* (2000) *Daily iron supplementation is more effective than twice weekly iron supplementation in pregnant women in Pakistan in a randomized double-blind clinical trial. J Nutr* **130**, 2697-2702.
30. Souza AI de, Batista Filho M, Ferreira LOC *et al.* (2004) *The effectiveness of three regimens using ferrous sulfate to treat anemia in pregnant women. Rev Panam Salud*

- Publica* **15**, 313-319.
31. Bresani CC, Braga MC, Felisberto DF, Tavares-de-Melo CEL, Salvi DB, Batista-Filho M. Accuracy of erythrogram and serum ferritin for the maternal anemia diagnosis (AMA): a phase 3 diagnostic study on prediction of the therapeutic responsiveness to oral iron in pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2013; 13:13. <http://www.biomedcentral.com/1471-2393/13/13>
 32. Souza AI, Batista Filho M, Bresani CC *et al.* (2009) *Adherence and side effects of three ferrous sulfate treatment regimens on anemic pregnant women in clinical trials. Cad Saúde Pública* **25**, 1225-1233.
 33. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD (2000) *Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. Prev Vet Med* **45**, 23-41.
 34. Walker P, Subasinghe R (editors) (2000) *DNA-based molecular diagnostic techniques: research needs for standardization and validation of the detection of aquatic animal pathogens and diseases. Report and proceedings of the Joint FAO/NACA/CSIRO/ACIAR/DFID Expert Workshop Bangkok, Thailand, 7-9 February 1999. FAO Fisheries Technical Paper no. 395. Rome: FAO.* <http://www.fao.org/docrep/005/X4946E/x4946e0b.htm>
 35. Bresani CC. Utilidade diagnóstica dos parâmetros eritrocitários, da classificação morfológica das hemácias e da ferritina sérica em gestantes de baixo risco: um estudo transversal [master's dissertation]. Recife: Postgraduate Program in Maternal and Child Health of Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira; 2007. http://www.imip.org.br/site/ARQUIVOS_ANEXO/mestrado%20cristiane%20campello;20071130.pdf

4.3 Artigo III - Protocolo de estudo - Acurácia do eritrograma e da ferritina sérica para o diagnóstico de anemia materna (AMA): um estudo de teste diagnóstico fase 3 sobre a predição de resposta terapêutica ao ferro oral na gravidez

Accuracy of erythrogram and serum ferritin for the maternal anemia diagnosis (AMA): a phase 3 diagnostic study on prediction of the therapeutic responsiveness to oral iron in pregnancy

Instituição

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-Fiocruz)

Autores

Cristiane C Bresani^{1,2} (autor para correspondência)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550

Telefone/Fax: (+55) (81)21224781 / (+55) (81)21224722

e-mail: cristiane.bresani@inss.gov.br

Maria C Braga^{3,4} - braga@cpqam.fiocruz.br

Daniel Falcão Felisberto⁵ - danielfalcaofelisberto@gmail.com

Carlos Eduardo Tavares-de-Melo⁵ - cadultmelo@hotmail.com

Debora Bresani Salvi¹ - deborasalvi@hotmail.com

Malaquias Batista-Filho^{1,4} - malaquias.imip@gmail.com

¹Grupo de Pesquisas em Nutrição do Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira – IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ²Instituto Nacional do Seguro Social/Ministério da Previdência Social – INSS/MPS (Av Jorn Mário Melo, 343, Santo Amaro, Recife – PE – Brasil, CEP: 50.040-010); ³Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-infantil do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ⁴Programa de Pós-graduação em Saúde Pública CPQAM/FIOCRUZ (Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil | CEP: 50.670-420); ⁵Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS (Av. Jean Emile Favre, 422 Imbiribeira, Recife – PE, CEP: 51.200-060).

Artigo publicado no *BMC Pregnancy and Childbirth* 2013; 13:13.

doi:10.1186/1471-2393-13-13

STUDY PROTOCOL

Open Access

Accuracy of erythrogram and serum ferritin for the maternal anemia diagnosis (AMA): a phase 3 diagnostic study on prediction of the therapeutic responsiveness to oral iron in pregnancy

Cristiane Campello Bresani^{1,2*}, Maria Cynthia Braga^{3,4}, Daniel Falcão Felisberto⁵, Carlos Eduardo Lopes Tavares-de-Melo⁵, Debora Bresani Salvi¹ and Malaquias Batista-Filho^{1,3}

Abstract

Background: Pregnancy anemia remains as a public health problem, since the official reports in the 70's. To guide the treatment of iron-deficiency anemia in pregnancy, the haemoglobin concentration is the most used test in spite of its low accuracy, and serum ferritin is the most reliable test, although its cutoff point remains an issue.

Methods/design: The aim of this protocol is to verify the accuracy of erythrocyte indices and serum ferritin (studied tests) for the diagnosis of functional iron-deficiency in pregnancy using the iron-therapy responsiveness as the gold-standard. This is an ongoing phase III accuracy study initiated in August 2011 and to be concluded in April 2013. The subjects are anemic pregnant women (haemoglobin concentration < 11.0 g/dL) attended at a low-risk prenatal care center in the Northeast of Brazil. The sample size ($n = 278$) was calculated to estimate sensitivity of 90% and 80% of specificity with relative error of 10% and power of 95%. This study has a prospective design with a before-after intervention of 80 mg of daily oral iron during 90 days and will be analyzed as a delayed-type cross-sectional study. Women at the second trimester of pregnancy are being evaluated with clinical and laboratorial examinations at the enrollment and monthly. The 'responsiveness to therapeutic test with oral iron' (gold-standard) was defined to an increase of at least 0.55 Z-score in haemoglobin after 4 weeks of treatment and a total dose of 1200 mg of iron. At the study conclusion, sensitivities, specificities, predictive values, likelihood ratios and areas under the ROC (Receiver Operating Characteristic) curves of serum ferritin and erythrocyte indices (red blood cell count, haematocrit, haemoglobin concentration, mean corpuscular volume, mean corpuscular haemoglobin, mean corpuscular haemoglobin concentration, red blood cell distribution width, reticulocyte count) will be tested. The compliance and adverse effects are considered confounding variables, since they are the main obstacles for the iron-therapy responsiveness.

Discussion: This study protocol shows a new approach on iron-deficiency anemia in pregnancy from a functional point of view that could bring some insights about the diagnostic misclassifications arising from the dynamic physiologic changes during the gestational cycle.

Trial registration: WHO International Clinical Trials Registry Platform U1111-1123-2605.

Keywords: Anemia, Iron-deficiency, Diagnosis, Pregnancy, Erythrocyte indices, Ferritins, Sensitivity, Specificity, Adverse effects, Patient compliance, Ferrous sulfate

* Correspondence: cristiane.bresani@inss.gov.br

¹Nutrition Research Group at Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira – IMIP, Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE CEP: 50.070-550, Brazil

²Instituto Nacional do Seguro Social/Ministério da Previdência Social – INSS/MP, Av Jorn Mário Melo, 343, Santo Amaro, Recife, PE CEP: 50.040-010, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

Background

Iron-deficiency anemia is recognized as the nutritional deficiency of highest prevalence in the world, reaching all continents and geo-economic blocks [1,2]. This is a serious problem in the gestation-puerperal period since the maternal anemia is associated with several adverse perinatal outcomes, such as prematurity, low birth weight and rates of maternal and perinatal mortality [3-9]. For instance, the relationship between maternal anemia and perinatal mortality contributed with 56% of 800,000 deaths attributed to iron-deficiency anemia globally in 2000 [9]. Hence, universal supplementation of iron during pregnancy has been widely recommended as a health policy from the 70's [1,10]. However, the prevalence of gestational anemia remains 50% globally and 20% in the Americas since then [1,2] which points to the failure of this measure, despite the effectiveness of the iron supplementation programs in the general population has been estimated to about 70% [1].

Apart of the concerning issues to the implementation degree and quality of the programs to control anemia, the main limiting factor of the effectiveness and efficacy of the interventions with iron supplements would be the poor compliance to therapy, which can achieve figures up to 70% at pregnancy [11,12] and is associated with the frequent occurrence (20-70%) of gastrointestinal adverse effects [13-18]. Taking into account that the therapeutic success depends on the total dose of iron ingested throughout the treatment [14,18], higher cure rates of anemia should be observed in the controlled context of clinical trials, whereas the therapeutic compliance would be maximized, however, these rates are around 50% [19,20]. Therefore, factors not related to the therapeutic dose of iron may be contributing to these modest results, among them could be mentioned the criteria used to indicate and evaluate the iron-therapy during pregnancy [1,2,10].

The haemoglobin concentration (Hb) has been considered as a *proxy* of iron deficiency and widely recommended as a criterion for the indication of iron-therapy in pregnant women, particularly in location with few resources [1]. The Hb cutoff point of 11.0 g/dL for pregnancy was defined from North American and European reference populations by the Gaussian paradigm: less than 2 standard deviations below the mean reference [1,21,22]. This is a theoretical statistic definition that assumes prevalence of 5% for all disorders and might not be suitable for all epidemiologic or clinical settings [23]. Indeed, the 70's guideline of the World Health Organization (WHO) considered that the Hb cutoff points defined from population distributions could be an oversimplification [10]; and some studies have observed that Hb and other erythrocyte indices present low correlation with the body iron reserves in pregnant women (sensitivity and specificity

around 60%) [24-29]. Thus, could be considered that diagnostic misclassifications of iron-deficiency anemia may be another limiting factor of the iron-therapy responsiveness in this life cycle phase.

In fact, the cross-sectional and longitudinal assessment of the haematological profile during pregnancy is troublesome due to increased iron requirements beside the haemodilution, a physiological phenomenon in which occur an increase of 50% in the plasma volume *versus* 30% in the erythrocyte mass [1,21]. This phenomenon is responsible for the U-shaped curve that Hb and haematocrit levels develop in pregnant women with nadir between the 24th and 28th weeks of pregnancy [24,30-32], which explains the "physiological anemia" in which the erythrocyte mass remains normal in relation to the effective body weight [1,7]. Based on this rationale, Beaton and McCabe (1999) developed the Hb Z-score methodology to correct its values according to the mean expected for the gestational week [33]. An alternative to a more accurate diagnosis of iron deficiency would be the dosage of biomarkers of iron metabolism, however, these are also influenced by gestational physiology and many have not been standardized to be used at pregnancy [1,34]. The serum ferritin remains as the biomarker that best correlates with the iron content in the bone marrow of pregnant women [24-27], but there is no consensus as to its cut-off point [1,34].

These observations indicate that the accurate diagnosis of iron-deficiency anemia during pregnancy is problematic. The current diagnostic criteria with steady cutoff points based on Gaussian definition of normality does not reflect the functional conceptions of the anemia and of the iron deficiency at pregnancy, respectively, as the status of insufficient circulating haemoglobin for oxygen transport required by gestational metabolism and as the inadequate iron supply to achieve this demand [1]. So, the hypothesis of AMA study is that the pre-treatment values of Hb and other erythrocyte indices have low power to predict the functional iron-deficiency in pregnancy and to discriminate iron-sufficient from iron-deficient pregnant women (potentially responsive to iron-therapy). It is expected that the serum ferritin presents higher accuracy parameters than erythrocyte indices.

Rationale for AMA study - phase III diagnostic accuracy study

Starting from the assumptions that erythrocyte indices have low accuracy for the diagnosis of iron deficiency in pregnant women in accuracy phase II studies [24-29], the AMA study was initiated. As an accuracy phase III study, it is being conducted in a population under a higher risk of iron deficiency [23]. Thereby, this study will evaluate and compare the accuracy of Hb and other erythrocyte indices and of serum ferritin for the diagnosis

of functional iron deficiency in anemic pregnant women (Hb < 11.0 g/dL), as pregnant women with Hb > 11.0 g/dL from the same location have very low rates of iron-deficiency [35].

In the absence of a gold standard to define functionally iron deficiency in pregnancy, was established as the reference standard the haematological response to oral iron-therapy, which is considered a reliable and low-cost alternative for the confirmation of anemia due to iron deficiency [1]. In this protocol, this approach considers the rationale of therapeutic definition of normality (therapeutic diagnostic) that employs the response to specific treatments in disease-target markers as the parameter to define diagnostic criteria [23]. This functional rationale is suitable for the pregnancy period because the dynamic physiologic changes on the erythrocyte indices and biomarkers of iron metabolism [30-34].

Taking into account that adverse effects and poor therapeutic compliance are the main limiting of intake of an effective dose of iron they were pre-established as confounding variables. Whereas the physiological fluctuation of Hb at each gestational week is a factor which can be bias the evaluation of the haematological response to iron-therapy [33], the pre and post treatment Hb values will be transformed into Z-scores for purposes to measure the outcome.

Methods/design

Study aim and objectives

The aim of this study is to describe and to compare, at the practice setting of prenatal care, the pragmatic utility of serum ferritin and each single test on erythrogram to discriminate iron-sufficient from iron-deficient pregnant women who will benefit from iron therapy to achieve the improvement of their anemia.

The *primary objective* of this study is to analyze the accuracy (sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios and Receiver Operating Characteristic curves) of Hb and other erythrocyte indices and of serum ferritin (studied tests) to predict the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron' (gold-standard test) in pregnant women pre-classified as anemic (Hb < 11.0 g/dL).

As a *secondary objectives* are proposed to compare the results of evaluation of the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron' using absolute values and Z-scores of Hb; and to describe the frequency of the therapeutic compliance and gastrointestinal adverse effects, as well as their association with the dose of iron intake and with the therapeutic response.

Study design

This study deals with a diagnostic validation of the pre-treatment values of erythrocyte indices and serum ferritin

(studied tests) in relation to the gold standard 'responsiveness to therapeutic test with oral iron' in women with low-risk singleton pregnancy. The design is classified as phase III as these tests already have been used in clinical practice and will be evaluated in anemic pregnant women [23], i.e., a population under risk of iron deficiency (target disease) with formal indication of oral iron therapy in accordance with the criterion adopted by WHO (Hb < 11.0 g/dL) [1]. The direction of the study is prospective (delayed-type cross-sectional study) with the purpose of observing the variation in the Hb values after a period of at least 4 weeks of a 'before-after' intervention with 80 mg of daily oral iron and to define the final diagnosis of the functional iron deficiency [36]. The measurement of target disease (iron deficiency) by the gold-standard ('responsiveness to therapeutic test with oral iron') has been carried out on all participants, such as post-treatment Hb has been assessed independently of the results of the studied tests (pre-treatment erythrocyte indices and serum ferritin). The final diagnosis of the functional iron deficiency will be blinded in relation to the tests results carried out at time-zero since it will be calculated by the Hb Z-scores methodology at the conclusion of the study.

The protocol is registered as a single-arm clinical trial in the Brazilian Clinical Trials Registry (REBEC) at the Ministry of Health of Brazil and in the WHO International Clinical Trials Registry Platform (U1111-1123-2605).

Study setting and period

This study is set in the prenatal care center of *Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira* (IMIP) at a large urban center in the Northeast of Brazil. IMIP is a regional tertiary hospital with reference in maternal-child health which serves primarily for high-risk pregnant women; however, around 600 low-risk pregnant women are attended monthly. Data collection was initiated in August 2011 in a pilot study phase in which was concluded in October 2011. The conclusion of this study is scheduled for April 2013.

Participants/eligibility criteria

The participants are 18-35 years old women with a low-risk singleton pregnancy. The inclusion criteria are Hb values ≥ 7.0 and < 11.0 g/dL and the gestational age between 12 and 32 weeks. Pregnant women are being excluded if they have a history of hypersensitivity or intolerance to ferrous sulfate, mental deficits or disorders that cannot correctly follow the prescription; tobacco, alcohol or other drugs use; prior diagnosis of another cause of anemia; or at the time of inclusion present active infectious disease (positive serology for Human Immunodeficiency Virus or syphilis, leukocytosis or leukocyturia with positive urine culture).

Recruitment, procedures and instruments

The recruitment procedure is a consecutive series of patients whose prenatal routine exams show anemia ($Hb < 11.0$ g/dL) and encounters all other eligibility criteria (Figure 1). The pregnant women are then invited to participate in the study at the time of the prenatal consultation to then clarify about the issue. After reading and signing the written informed consent form, an initial consultation begins (C_0) with a structured questionnaire and the anthropometric variables measurement (weight and height). At this moment, the prescription for the drug intervention proceeds under the proper guidance and then the pregnant woman is guided to perform the initial laboratory tests (complete blood count, reticulocyte count and serum ferritin).

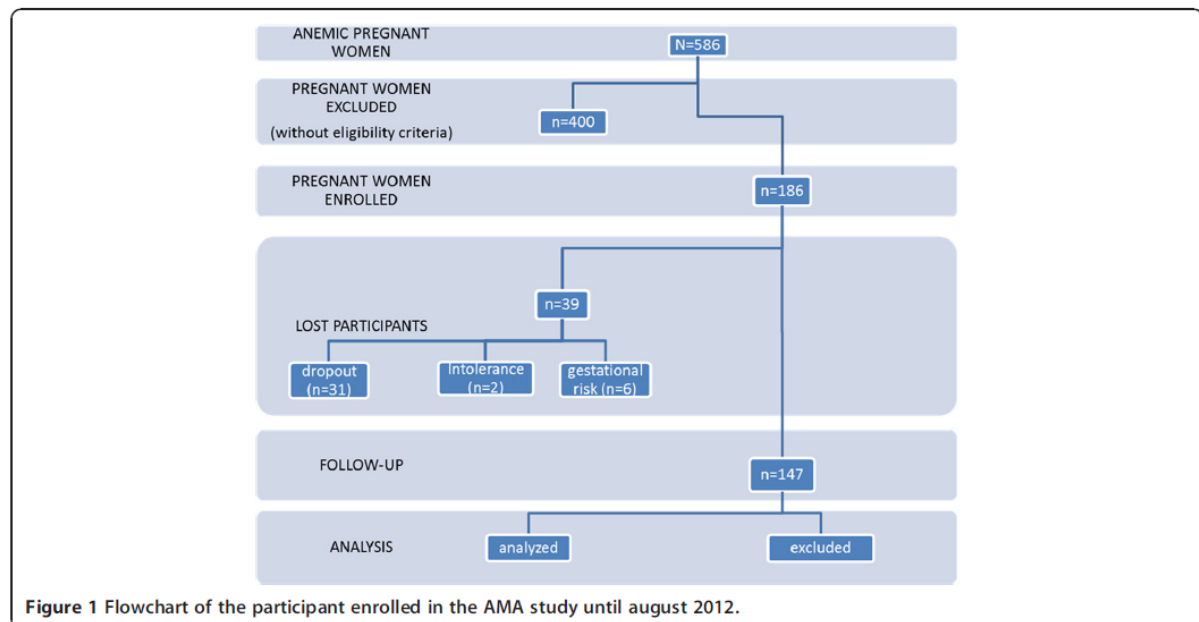
The pregnant women are measured and weighed barefooted, without any objects in their hands or in their pockets on a calibrated electronic scale. It is requested that all pregnant women attend the laboratory in the morning within 8–12 hours of fasting to collect blood samples. The blood samples are collected and properly identified by the process of collecting in the routine service, through venipuncture in the antecubital fold. The erythrograms are analyzed using flow cytometry and absorbance of an automatic hematological analyzer (ABX Pentra DF120 Horiba brand) calibrated daily, and are complemented with a microscopic reading of smears stained with a panoptic dye to morphologically study of the cells. The reticulocyte count is performed by a manual method by reading of smears stained with brilliant cresyl blue dye. The serum ferritin is measured by chemiluminescence immunoassay in blood sample collected in dry tube,

using the same kit and following the calibration according to the international standards of WHO.

All non-laboratorial variables are obtained using a standardized form developed specifically for the research. The laboratory data are recovered directly by a computerized system of results generated electronically by the automated equipment of biological analysis. The laboratory tests of the pilot study ($n = 23$) were performed by the laboratory of the institution. After the conclusion of the pilot study (October 2011), for operational reasons, the laboratorial analysis service was outsourced to an external laboratory. Both laboratories have governmental certification and follow standardized operational norms.

Intervention

The treatment consists of two daily doses of 109 mg of ferrous sulfate in the form of pills with 40 mg of elemental iron (Hematofer[®], Prati Donaduzzi & Cia LTDA). Three blisters with 20 pills are given at the enrollment (C_0) and at the two monthly reevaluations (C_1 , C_2). The pregnant women are oriented at each consultation to ingest the medication with a glass of drinking water, 30 minutes before a meal, and to preserve the non-consumed pills in the blisters. The safety profile for the use of ferrous sulfate at pregnancy is satisfactory; there were no reports of fetal damage or severe maternal adverse events [19,20]. The dose of 80 mg/daily of elemental iron was adopted due to the set of evidences not found any additional efficacy with higher daily doses [14,19].



Follow-up and withdrawal criteria

The prescribed treatment provides a follow-up period of 90 days. The follow-up is stopped before this period in case of evolution to high-risk pregnancy, genital bleeding, childbirth delivery, drop out of treatment, use of another type of iron supplement, drug intolerance, cure or aggravation of anemia. The participants are evaluated monthly (C₁, C₂, C₃), and information about gastrointestinal symptoms and therapeutic compliance is collected by the standardized form, such a venous blood sample to obtain Hb is prompted. Pregnant women who present drug intolerance, severe anemia (Hb < 7.0 g/dL) or Hb values drop more than 1.0 g/dL during the follow-up are referred to an individualized conduct. Those who present Hb > 11.0 g/dL before 90 days of the overall follow-up will begin to use supplemental doses of oral iron (40 mg/daily).

Studied tests (predictive variables)

The initial values of the erythrocyte indices and serum ferritin will be tested as predictors of presence of the functional iron deficiency at the following cutoff points suggested by WHO and Centers for Disease Control and Prevention (CDC) on pregnant or childbearing age women (when there is no specific report for pregnant women): red blood cells count < 3.8 10¹² cells/L; Hb < 10.5 g/dL (suggested for the 2nd trimester of pregnancy); haematocrit < 32.0% (suggested for the 2nd trimester of pregnancy); mean corpuscular volume (MCV) < 81.0 fL; mean corpuscular haemoglobin (MCH) < 26.0 pg; mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) < 32.0 g/dL; red blood cells distribution width (RDW) > 14.0%; reticulocyte count < 1.0%; serum ferritin < 12.0 ng/mL [1,21,22].

Gold-standard test (outcome variable)

The final diagnosis of iron deficiency will be set individually on the basis of the presence (case) or absence (non-case) of the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron', starting from assumptions that, in the case of iron deficiency in pregnancy, a functional definition would be more appropriate [37] and the haematologic response to the treatment is considered as a reliable indicator of functional iron need [1]. This is one of the alternative approaches in the definition of the gold-standard which is based on the follow up of the clinical course during a suitable predefined period under a therapeutic intervention [36].

To measure this outcome, the physiological variability of Hb throughout the pregnancy was taken into consideration, because it distorts the interpretation of longitudinal trends of Hb absolute values [33]. Thus, on the rationale basis developed by Beaton and McCabe in 1999, the pre and post treatment Hb values of each

pregnant woman will be adjusted to the gestational week through the Z-score methodology [33]. This methodology quantifies the difference (in standard deviation units-SD) between an observed Hb value and the gestational week's reference mean from a reference distribution curve [33]. Due to the lack of a Brazilian reference curve will be used the curve reported from iron-supplemented healthy women from Europe and North-America which was employed by Beaton and McCabe [21,22,33]. The individual calculation of the Z-score is carried out according to the following mathematical formula:

$$\text{HbZ-score} = \frac{(\text{Hb value observed} - \text{mean of Hb expected})}{\text{SD of the reference population}}$$

It was determined as a final diagnosis of functional iron deficiency the partial therapeutic responsiveness by increase of at least 0.55 Hb Z-score after a minimum of 4 weeks treatment and an intake of at least 1200 mg of elemental iron as a total dose, based on the following assumptions:

- An increase of 1 g/dL on the Hb after 30 to 60 days of oral iron therapy is a reliable indicator of iron deficiency in individuals or populations [1].
- The haematological improvement depends on the total dose of iron intake considering that the dose of 1200 mg of elemental iron is responsible for most of the effect on the Hb values [14].
- The standard deviation of the Hb distribution in populations of pregnant women is 0.9 g/dL, independently of gestational age [33].
- By mathematics definition, 1 Z-score corresponds to 1 SD, that is, equal to 0.9 g/dL of Hb at pregnancy. Therefore, the difference of 0.55 SD between the post and pre-treatment Hb Z-scores represents a relative increase of 0.5 g/dL (0.55 × 0.9 g/dL) in the Hb *status* of a pregnant woman.

Confounding variables (secondary outcomes)

Treatment compliance and adverse effects are being evaluated every 30 days and recorded in the pregnant women's individual form with a goal to reduce losses and ensure the intake of the effective total dose of iron with minimal symptomatic discomfort for the pregnant women. Women who do not achieve the minimum adherence (intake of 30 pills = 1200 mg of elemental iron) will not be evaluated for the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron'. The frequency of the good adherence to the treatment will be reported as an intake at least 75% of the prescribed monthly pills, according to pregnant women's information and pill counting. This percentage was determined on the basis of the proportion

of the monthly treatment prescribed that corresponds to the total monthly dose of 1800 mg of elemental iron, which is considered responsible for almost the entire effect in Hb levels according to Ekström *et al.* (2002) [14].

According to pregnant women's information the presence of the adverse effects was defined as the appearance of the following symptoms after the beginning of the intervention: abdominal pain/abdominal cramps, diarrhea (increasing number of evacuations or reduction of the stools consistency), constipation (reducing number of evacuations or hardening of stools), nausea, vomiting and heartburn (epigastric burning or heartburn) [38]. The women who developed symptoms related to the medication are orientated case by case to ingest the pills along with the meals or temporarily reduce the dosage for a pill a day.

The following *co-variables* are being collected for the sample characterization: age, city of residence, education level, socioeconomic class (economic classification criteria Brazil 2010) [39], marital status; anthropometric classification by the body mass index (Atalah *et al.* standard) [40], number of pregnancies, births or miscarriages and last inter-gestational interval. The gestational age is being defined as complete weeks from the date of the last menstrual period and confirmed by ultrasound estimation. In pregnant women who do not remember their last menstrual period, the gestational age will be based solely on the ultrasound examination.

Statistical issues

Sample size

The sample size (43 cases and 97 non-cases) was calculated to estimate 90% of sensitivity and 80% of specificity, with relative error of 10% and the power of 95%. Considering cure rates of 50% and 30% of losses or poor adherence to treatment [38,41], 278 anemic pregnant women should be recruited.

Operational and data analysis

The data are being released with dual input and processed in the EPIINFO3.4.2 program. The analytical design is as a delayed-type cross-sectional study, where at the end of the follow-up, the measured tests at time-zero (predictive variables) will be compared with the final diagnosis of the target-disease (outcome variable) to determine estimates of accuracy [36]. Thus, at the end, the proportions and its confidence intervals will be calculated for sensitivity, specificity, accuracy, predictive values, likelihood ratios and areas under the ROC curves of each erythrocyte index and serum ferritin against the presence or absence of the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron'. The significance level adopted will be 5%. The estimates will be made according to the 3 × 3 table for the results distribution from diagnostic accuracy phase III studies, which have cells to report uncompleted

results (lost, not performed or indeterminate) of the gold standard and the studied tests [23]. This table enables to report the results unknown that could bias the measurement of accuracy at a clinical practice setting (Table 1).

Pilot study and interim analysis

During the period of the pilot study 106 anemic pregnant women were identified, which 39 fulfilled the eligibility criteria with the acceptance of 100% to participate in the research. The loss percentage was 41% due to dropout (9), gestational risk (5) and drug intolerance (2). Low therapeutic adherence (intake of less than 75% of pills) was observed in 30.4% (7/23) and the most incidents of adverse effects were nausea (25.8%), heartburn (21.5%) and constipation (17.2%).

An interim analysis of collected data will be performed on 186 pregnant women enrolled until August 2012, whose follow-ups were completed in November 2012, to verify the number of cases and non-cases and estimate the additional time necessary to achieve the sample size.

Ethical issues

This protocol follows the Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects of the Declaration of Helsinki and the 196/96 resolution from the National Health Council of Brazil. This study has the ethical approval for the human experimentation by IMIP Research Ethics Committee under the number 2050–10. The participants are duly informed about the research explained by the team and are enrolled in the study after having assigned the written informed consent form.

Financing

This trial was funded by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) of Brazilian Government as a nested study to the cross-sectional multicenter survey '*Pregnant women nutritional status in the state of Pernambuco: methodological, epidemiological aspects and implications in pre-natal care*'.

Discussion

Pregnancy is a period marked by singularities in the physiology of the body fluids and erythropoiesis, so both haemodilution and iron deficiency leads to anemia and this discrimination becomes difficult [21,34,37]. The protocol study AMA applies a new approach to the problem of diagnosis of iron-deficiency anemia in pregnancy, regarding to the design of the study and to the definition of the target disease. As a phase III study, the diagnostic accuracy of the tests will be evaluated in the practical context of prenatal care, where the contrast between the presence and the absence of iron deficiency is attenuated making it difficult to distinguish pregnant women who are or not potentially iron responsive [23,36].

Table 1 The table 3 × 3 to distribute the tests results on phase III accuracy studies

Diagnostic test result (erythrocyte indices or serum ferritin)	Reference standard 'responsiveness to therapeutic test with oral iron'			Total
	Iron deficiency present	Lost, not performed or indeterminate	Iron deficiency absent	
Positive	a	v	b	
Lost, not performed or indeterminate	w	x	y	
Negative	c	z	d	
Total				

Thus, this study design needs larger samples, which makes its use uncommon [36].

In the absence of a gold standard, the haematological response to oral iron was adopted as the reference standard in order to define iron deficiency in pregnancy under the functional point of view. This approach aims to evaluate the pragmatic usefulness of erythrogram and serum ferritin to identify pregnant women who would benefit from iron therapy to achieve the improvement of their anemia, which should be the theoretical purpose of the current guideline in recommending iron-therapy for all pregnant women with Hb < 11.0 g/dL [1]. However, the gold-standard 'responsiveness to therapeutic test with oral iron' is the main fragility of this protocol, because it is subordinate to the total dose of iron ingested, the effective absorption of iron ingested and the reliable measurement of haematological response [14,33]. Thus, the follow up on therapeutic compliance and adverse effects was incorporated into the protocol so it can be a guarantee the intake of the effective total dose of iron. With regard to the absorption of iron ingested, it was considered that it would not constitute an important limiting factor to the therapeutic response since it increases up to 40% during pregnancy [34]; furthermore the women are being guided to take the iron pills in the most effective way.

An important issue addressed in the protocol method is the physiologic fluctuation of the Hb absolute values which could bias the therapeutic efficacy measurements during the follow-up trial period [24-29]. Beaton and McCabe (1999) argued that, depending on the gestational week in which the treatment of anemia is initiated and concluded, variations observed in the Hb levels may be attributed to its physiological curve and could be confounded with the therapeutic effects. These authors reanalyzed 21 trials with oral iron in children and pregnant women and observed important differences between the outcomes assessed by Hb absolute values and by the Hb Z-scores [33]. Thus, in this protocol the post and pre-treatment difference in Hb values of each pregnant woman will be measured in the Z-scores, aiming to neutralize the variability intra-observation, resulting from physiological Hb curve of each woman, and the variability inter-observation, arising from the different

gestational ages represented in the sample. Despite its appropriateness, the Z-score methodology has been scarcely used in clinical trials of treatments for iron-deficiency anemia in pregnancy [19]; for instance, Mumtaz *et al.* (2000) were the only one to apply the Hb Z-scores among 23 clinical trials reviewed in the most recent meta-analysis [19,42].

In addition to these methodological questions, this study found its own operational limitations of the routine at a prenatal service in our location, particularly regarding to the patients' return for clinical follow-up and the effective performance of laboratorial exams. The excessive loss rate of the pilot study was overcome with strategies which have strengthened the follow-up and the laboratory analyzes. The percentage of adverse effects agreed with the literature, signaling the continuance of the study in order to ensure the effective dose of iron intake and the safety standard of the medication [11-17]. At the end of the study, we hope that the results will bring some clarification on the role of Hb and serum ferritin in the diagnosis of iron deficiency in pregnancy and that allows us to question the paradigm that "the prevalence of iron deficiency anemia in a population is statistical rather than physiological concept" (WHO, 2001) [1].

Competing interests

The authors declare that they have no any financial competing interests as well as other potential conflicts of interest related to this study.

Authors' contributions

CCB, MCB and MB conceived and designed this protocol. CCB, DFF, CET and DBS are carrying out the acquisition of data. CCB is performing the study coordination. All authors read, critically revised and approved this manuscript.

Acknowledgements

We thank Dr. José Natal Figueirôa for his assistance in building the database and planning data analysis.

Author details

¹Nutrition Research Group at Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira – IMIP, Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE CEP: 50.070-550, Brazil. ²Instituto Nacional do Seguro Social/Ministério da Previdência Social – INSS/MPS, Av. Jorn Mário Melo, 343, Santo Amaro, Recife, PE CEP: 50.040-010, Brazil. ³Postgraduate Program in Maternal and Child Health of IMIP, Rua dos Coelhos, 300, Boa Vista, Recife, PE CEP: 50.070-550, Brazil. ⁴Postgraduate Program in Public Health at Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz – CPQAM/FIOCRUZ, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária,

Recife, PE CEP: 50.670-420, Brazil. ⁵Faculdade Pernambucana de Saúde – FPS, Av. Jean Emile Favre, 422 Imbiribeira, Recife, PE CEP: 51.200-060, Brazil.

Received: 13 December 2012 Accepted: 8 January 2013
 Published: 16 January 2013

References

- World Health Organization: *Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control – a guide for program managers*. Geneva, Switzerland: WHO; 2001.
- World Health Organization: *Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia*. Geneva, Switzerland: WHO; 2008.
- Murphy JF, O'Riordan J, Newcombe RG, Coles EC, Pearson JF: **Relation of haemoglobin levels in first and second trimesters to outcome of pregnancy**. *Lancet* 1986, **1**:992–995.
- Steer P, Alam MA, Wadsworth J, Welch A: **Relation between maternal haemoglobin concentration and birth weight in different ethnic groups**. *Br Med J* 1995, **310**:489–491.
- Allen LH: **Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome**. *Am J Clin Nutr* 2000, **71**(Suppl):1280–1284.
- Scholl TO, Reilly T: **Anemia, iron and pregnancy outcome**. *J Nutr* 2000, **130**:443.
- Yip R: **Significance of an abnormally low or high haemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition**. *Am J Clin Nutr* 2000, **72**(Suppl):272–279.
- Rasmussen KM: **Iron deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Is there a causal relationship between iron deficiency or iron-deficiency anemia and weight at birth, length of gestation and perinatal mortality?** *J Nutr* 2001, **131**(Suppl): 590–603.
- Stoltzfus RJ: **Iron deficiency: global prevalence and consequences**. *Food Nutr Bull* 2003, **24**(Suppl 4):99–103.
- World Health Organization: *Control of nutritional anaemia with special reference to iron deficiency*. Technical Report Series no. 580. Geneva, Switzerland: WHO; 1975.
- United Nations Children's Fund/World Health Organization: *Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children*. Geneva, Switzerland: UNICEF/WHO; 1999.
- Hyder SM, Persson LA, Chowdhury AM, Ekström EC: **Do side-effects reduce compliance to iron supplementation? A study of daily- and weekly-dose regimens in pregnancy**. *J Health Popul Nutr* 2002, **20**:175–179.
- Ekström ECM, Kavisho FP, Habicht JP, Frongillo EA Jr, Rasmussen KM, Hemed L: **Adherence to iron supplementation during pregnancy in Tanzania: determinants and hematologic consequences**. *Am J Clin Nutr* 1996, **64**:368–374.
- Ekström EC, Hyder SM, Chowdhury AM, Chowdhury SA, Lönnerdal B, Habicht JP, Persson LA: **Efficacy and trial effectiveness of weekly and daily iron supplementation among pregnant women in rural Bangladesh: disentangling the issues**. *Am J Clin Nutr* 2002, **76**:1392–1400.
- Makrides M, Crowther CA, Gibson RA, Gibson RS, Skeaff CM: **Efficacy and tolerability of low-dose iron supplements during pregnancy: a randomized controlled trial**. *Am J Nutr* 2003, **78**:145–153.
- Kumar A, Jain S, Singh NP, Singh T: **Oral versus high dose parenteral iron supplementation in pregnancy**. *Int J Gynecol Obstet* 2005, **89**:7–13.
- Saha L, Pandhi P, Gopalan S, Malhotra S, Saha PK: **Comparison of efficacy, tolerability, and cost of iron polymaltose complex with ferrous sulphate in the treatment of iron deficiency anaemia in pregnant women**. *Med Gen Med* 2007, **9**:1.
- Zhou SJ, Gibson RA, Crowther CA, Makrides M: **Should we lower the dose of iron when treating anaemia in pregnancy? A randomized dose–response trial**. *Eur J Clin Nutr* 2009, **63**:183–190.
- Revez L, Gyte GML, Cuervo LG, Casasbuenas A: *Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy*. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, The Cochrane Library. doi:10.1002/14651858.CD003094.pub2. Issue 11, Art. No. CD003094.
- Peña-Rosas JP, De-Regil LM, Dowswell T, Viteri FE: *Intermittent oral iron supplementation during pregnancy*, The Cochrane Library. doi:10.1002/14651858.CD009997.pub7. Issue 11, Art. No. CD009997.
- Centers for Disease Control and Prevention: **Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States**. *MMWR Recomm Rep* 1998, **47**((RR-3):1–36.
- Centers for Disease Control and Prevention: **Iron Deficiency - United States, 1999–2000**. *MMWR Recomm Rep* 2002, **51**(40):897–899.
- Sackett DL, Haynes RB: **The architecture of diagnostic research**. In *The evidence base of clinical diagnosis*. Edited by Knottnerus JA. London: BMJ books; 2002:19–37.
- Puolakkka J, Jänne O, Pakarinen A, Vihko R: **Serum ferritin in the diagnosis of anemia during pregnancy**. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1980, **95** (Suppl):57–63.
- Thompson WG: **Comparison of tests for diagnosis of iron depletion in pregnancy**. *Am J Obstet Gynecol* 1988, **159**:1132–1134.
- Volpi E, De Grandis T, Alba E, Mangione M, Dall'Amico D, Bollati C: **Variations in ferritin levels in blood during physiological pregnancy**. *Minerva Ginecol* 1991, **43**:387–391.
- van den Broek NR, Letsky EA, Shenkin A: **Iron status in pregnant women: which measurements are valid?** *Br J Haematol* 1998, **103**:817–824.
- Tam KF, Lao TT: **Haemoglobin and red cell indices correlated with serum ferritin concentration in late pregnancy**. *Obstet Gynecol* 1999, **93**:427–431.
- Casanova BF, Sammel MD, Macones GA: **Development of a clinical prediction rule for iron deficiency anemia in pregnancy**. *Am J Obstet Gynecol* 2005, **193**:460–466.
- Petraglia B, da Silva LGP, de Rezende Filho J, Netto HC, Montenegro CAB: **Avaliação dos valores eritrocitários no ciclo grávido-puerperal**. *J Bras Ginecol* 1994, **1014**:139–144.
- van Buul EJ, Steegers EA, Jongsma HW, Eskes TK, Thomas CM, Hein PR: **Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study**. *Neth J Med* 1995, **46**:73–85.
- Milman N, Byg KE, Agger AO: **Haemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation**. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2000, **79**:89–98.
- Beaton GH, McCabe GP: *Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anemia in developing countries - an analysis of experience: final report to the Micronutrient Initiative (MI)*. Canada, Toronto: MI/Canadian International Development Agency (CIDA); 1999.
- Milman N: **Iron and pregnancy – a delicate balance**. *Ann Hematol* 2006, **85**:559–565.
- Bresani CC, Souza AI, Batista Filho M, Figueirôa JN: **Anemia and iron deficiency in pregnant women: disagreements among the results of a cross-sectional study**. *Brazilian Journal of Mother and Child Health* 2007, **7** (Suppl 1):15–22.
- Knottnerus JA, Muris JW: **Assessment of the accuracy of diagnostic tests: the cross-sectional study**. In *The evidence base of clinical diagnosis*. London: BMJ books; 2002:39–59.
- Beaton GH: **Iron needs during pregnancy: do we need to rethink our targets?** *Am J Clin Nutr* 2000, **72**(Suppl):265–271.
- Souza AI, Batista Filho M, Bresani CC, Ferreira LOC, Figueirôa JN: **Adherence and side effects of three ferrous sulfate treatment regimens on anemic pregnant women in clinical trials**. *Cad Saude Publica* 2009, **25**:1225–1233.
- Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa: *Critério de Classificação econômica Brasil*. 2010. <http://www.abep.org>.
- Atalah SE, Catillo LC, Castro SR, Aldea PA: **Propuesta de un nuevo estándar de evaluación nutricional de embarazadas**. *Rev Med Chil* 1997, **125**:1429–1436.
- de Souza AI, Batista Filho M, Ferreira LOC, Figueirôa JN: **The effectiveness of three regimens using ferrous sulfate to treat anemia in pregnant women**. *Rev Panam Salud Publica* 2004, **15**:313–319.
- Mumtaz Z, Shahab S, Butt N, Abdur Rab M, De Mtuynck A: **Daily iron supplementation is more effective than twice weekly iron supplementation in pregnant women in Pakistan in a randomized double-blind clinical trial**. *J Nutr* 2000, **130**:2697–2702.

doi:10.1186/1471-2393-13-13

Cite this article as: Bresani et al: Accuracy of erythrogram and serum ferritin for the maternal anemia diagnosis (AMA): a phase 3 diagnostic study on prediction of the therapeutic responsiveness to oral iron in pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2013 **13**:13.

4.4 Artigo IV - Artigo original - Acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica no diagnóstico da anemia ferropriva materna (AMA): um estudo sobre a predição da resposta terapêutica à ferroterapia oral

Instituição

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM-Fiocruz)

Autores

Cristiane C Bresani¹ (autor para correspondência)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550

Telefone/Fax: (+55) (81)21224781 / (+55) (81)21224722

e-mail: cristiane.campellobresani@mail.utoronto.ca

Maria C Braga^{2,3} - braga@cpqam.fiocruz.br

José N Figueirêdo² - natal@imip.org.br

Malaquias Batista-Filho^{1,2} - malaquias.imip@gmail.com

¹Grupo de Pesquisas em Nutrição do Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira – IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ²Programa de Pós-graduação em Saúde Materno-infantil do IMIP (Rua dos Coelhos, 300 | Boa Vista, Recife – PE – Brasil | CEP: 50.070-550); ³Programa de Pós-graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz – CPqAM/Fiocruz (Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE – Brasil | CEP: 50.670-420).

Artigo a ser submetido para publicação em revista científica intencional Qualis A.

Resumo

Objetivos: verificar a acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica (FS) para o diagnóstico da deficiência de ferro em gestantes anêmicas, aplicando como padrão-ouro a resposta terapêutica a uma intervenção com ferro oral. **Métodos:** trata-se de um estudo de validação diagnóstica de fase III com delineamento prospectivo, aplicando uma intervenção do tipo antes-e-depois com 80 mg diários de ferro elementar oral por 28 a 90 dias. Entre agosto/2011 e outubro/2012 144 mulheres no 2º e 3º trimestres de gravidez com concentração de hemoglobina (Hb) <11,0 g/dL foram recrutadas no pré-natal de baixo risco do Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP), Recife-Brasil. As participantes foram avaliadas com exames clínicos e laboratoriais à inclusão e após 30, 60 e 90 dias. A resposta terapêutica foi definida como um aumento de pelo menos 0,55 escore Z de Hb, após um tratamento mínimo de 30 drágeas com 40 mg de ferro elementar, ao longo de quatro semanas. Ao final, foram estimados sensibilidades, especificidades, valores preditivos, razões de verossimilhança e áreas sob as curvas *ROC* (*Receiver Operating Characteristic*) dos índices eritrocitários e da FS pré-tratamento em comparação com a *resposta a teste terapêutico com ferro oral*. **Resultados:** a contagem de eritrócitos apresentou sensibilidade (Se) de quase 90% e especificidade (Es) de 20%; enquanto a contagem de reticulócitos, Se de 5% e Es acima de 90%. A Hb e o hematócrito apresentaram Se e Es em torno de 50%. Índices morfológicos (volume corpuscular médio-VCM, hemoglobina corpuscular média-HCM, concentração de hemoglobina corpuscular média-CHCM, *red blood cell distribution width-RDW*) e FS apresentaram Se em torno ou abaixo de 30% com Es acima de 70%. Todos os testes apresentaram valores preditivos negativos acima de 70%, valores preditivos positivos em torno de 40% (ou abaixo), acurácias diagnósticas em torno de 50%, razões de verossimilhança positivas e negativas em torno de 1,0 e áreas sob as curvas *ROC* entre 0,51 (eritrócitos, VCM e *RDW*) e 0,64 (CHCM). **Conclusões:** valores pré-tratamento dos índices eritrocitários e da FS são pouco informativos para detecção e predição da presença anemia com necessidade de ferro em gestantes e apresentam baixo poder para discriminar gestantes que irão ou não responder à ferroterapia em curto prazo.

Palavras-chaves: Anemia Ferropriva, Diagnóstico. Gravidez. Sensibilidade. Especificidade. Efeitos Adversos. Sulfato Ferroso. Cooperação do paciente.

Abstract

Objectives: To describe the accuracy of erythrocyte indices and serum ferritin (SF) to diagnose the iron-deficiency in anemic pregnant women, applying as the gold-standard test the therapeutic response to an oral iron intervention. **Methods:** This is a phase III accuracy study at the low risk prenatal care of the Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP), Recife-Brazil. It was designed prospectively as a before-and-after intervention with 80 mg of elemental iron during 28-90 days. Between August 2011 and October 2013, 144 women at 2nd and 3th trimester of pregnancy and with haemoglobin concentration (Hb) <11.0 g/dL) were enrolled and were evaluated with clinical and laboratory examinations at inclusion and after 30, 60 and 90 days. The therapeutic response was defined as an increase of at least 0.55 Hb Z-score after at least 4 weeks of treatment with 30 pills of ferrous sulfate with 40 mg of elemental iron. The sensitivity, specificity, predictive values, likelihood ratios and the ROC curves (Receiver Operating Characteristic) of pretreatment erythrocyte indices and SF were estimated against the 'responsiveness to therapeutic test with oral iron'. **Results:** The red blood cell count had sensitivity (Se) of almost 90% and specificity (Sp) of 20%, while the reticulocyte count had Se of 5% and Sp above 90%. The Hb and hematocrit showed Se and Sp around 50%. SF and morphological indices (mean corpuscular volume-MCV, mean corpuscular haemoglobin-MCH, mean corpuscular haemoglobin concentration-MCHC, red blood cell distribution width-RDW) showed Se around or below 30% with Sp above 70%. All tests showed negative predictive values above 70%, positive predictive values around 40% (or below), diagnostic accuracies around 50%, positive and negative likelihood ratios around 1.0 and areas under the ROC curves between 0.51 (red blood cell count, MCV and RDW) and 0.64 (MCHC). **Conclusions:** The values of erythrocyte indices and SF pre-treatment are uninformative to detect and to predict the iron need in anemic pregnant women and have low power to discriminate women who will or will not respond to iron-therapy in short term.

Keywords: Anemia, Iron-Deficiency, Diagnosis. Pregnancy. Sensitivity. Specificity. Ferrous Sulfate. Adverse Effects. Patient Compliance.

Introdução

Uma série de estudos a partir da década de 80 tem mostrado que a anemia materna, particularmente por deficiência de ferro, é associada a baixo peso ao nascer e prematuridade,¹⁻¹⁰ assim como às mortalidades materna e perinatal.¹¹⁻¹³ No entanto, a despeito das políticas e programas voltados à redução da anemia na população materno-infantil, a prevalência global da anemia em gestantes permanece em torno de 50%.¹⁴⁻¹⁸ Em 2006, 80% das nações apresentavam carga de anemia na gravidez considerada moderada (entre 20 e 40%) ou grave (>40%), incluindo o Brasil com prevalência estimada em 30%.¹⁸ Esses dados indicam o insucesso das medidas de controle, particularmente, o uso de profilaxia universal com ferro e o uso ferroterapia de acordo com o valor de hemoglobina como critério único e estático.

Problemas referentes à adesão terapêutica e aos efeitos adversos aos sais de ferro oral são considerados os principais responsáveis pela baixa efetividade dos programas de suplementação com ferro.¹⁵ Entre 25 e 70% das gestantes apresentam má adesão terapêutica e queixas gastrointestinais com a reposição oral de ferro.¹⁹⁻²⁸ Todavia, no cenário controlado dos estudos de intervenção, ainda que seja assegurada a ingestão de uma dose de ferro considerada eficaz, as taxas de cura de anemia materna situam-se em torno de 50%.^{20,28,29} Por conseguinte, além dos fatores relacionados à dose total de ferro ingerida, dificuldades na correta identificação da deficiência de ferro em gestantes podem estar implicadas nas falhas terapêuticas.

A concentração de hemoglobina (Hb) e o hematócrito (HTC) são os testes diagnósticos de uso mais difundido,^{29,30} sendo considerados como *proxy* de anemia ferropriva com base no pressuposto de que possuiriam alta sensibilidade.¹⁶ No entanto, estudos mostram que os índices eritrocitários têm baixa acurácia para o diagnóstico de deficiência de ferro durante a gravidez.³¹⁻³⁷ Consequentemente, na falta de padronização de outros biomarcadores do metabolismo de ferro na gestação, a dosagem sérica da ferritina ainda tem sido considerada o teste mais acurado para o diagnóstico da deficiência de ferro materna.^{16,31,34} Todavia, os seus pontos de corte ainda não são consenso, tendo em vista a escassez de estudos de validação.^{31,34}

A fraca correlação dos valores da maioria desses testes hematológicos com o *status* de ferro corporal das gestantes pode ser atribuída às alterações fisiológicas que ocorrem na eritropoiese e na volemia durante a gestação,^{31,34,35,37} e que resultam no acréscimo de 30% na massa de células vermelhas contra 50% na expansão plasmática.³⁸⁻⁴⁰ Consequentemente, a hemodiluição gravídica provoca uma redução fisiológica e autolimitada nos valores sanguíneos de eritrócitos, Hb e HTC, delineando uma curva em formato de “U” com nadir

entre a 24^a e 28^a semanas de gestação, mesmo em mulheres suplementadas com ferro.⁴¹⁻⁴⁶ Por sua vez, o aumento da utilização do ferro corporal tem sido implicado na queda progressiva de HCM (hemoglobina corpuscular média) e CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) observada durante a gravidez;^{43,45} enquanto a intensificação da eritropoiese com surgimento de eritrócitos jovens no sangue periférico podem levar à elevação que se observa nos valores de *RDW* (*red blood cells distribution width*) e reticulócitos,⁴⁵⁻⁴⁸ assim como nos valores do VCM (volume corpuscular médio).^{41,43,44} Essas modificações fisiológicas também são responsáveis por oscilações nos níveis séricos da ferritina que se elevam no 1º trimestre de gravidez e declinam em até 30-50% no 2º trimestre.^{41,43,44,49-52}

A inacurácia diagnóstica e as alterações fisiológicas dos testes hematológicos, em geral, não são consideradas no manejo clínico da anemia ferropriva em gestantes, tão pouco na sua investigação científica.²⁹ Conseqüentemente, a seleção de pacientes para ferroterapia, com base no critério da Hb < 11,0 g/dL (ou 10,5 g/dL no 2º trimestre) fica vulnerável a erros de classificação diagnóstica. Partindo-se desses pressupostos, o estudo AMA teve a finalidade de avaliar a utilidade pragmática dos índices eritrocitários e da ferritina sérica na identificação de gestantes que se beneficiariam da ferroterapia indicada com base nesse critério protocolar da Hb. Para tal, os parâmetros de acurácia diagnóstica foram estimados em mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação de baixo risco, adotando-se como padrão-ouro a *resposta a teste terapêutico com ferro oral*, com base no conceito do diagnóstico terapêutico da deficiência funcional de ferro (doença-alvo).

Métodos

O estudo foi delineado como um estudo de validação de fase III para o diagnóstico da deficiência funcional de ferro em gestantes anêmicas, tendo como testes-índice os valores pré-tratamento da ferritina sérica e de cada parâmetro do eritrograma: eritrometria, Hb, HTC, VCM, HCM, CHCM, *RDW* e contagem de reticulócitos. O diagnóstico da doença-alvo apoiou-se no conceito terapêutico da normalidade,⁵³ sendo definido como a presença de *resposta a teste terapêutico com ferro oral* (padrão-ouro) após uma intervenção em braço único (ensaio clínico do tipo antes-e-depois). O protocolo foi publicado previamente,⁵⁴ depois de ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição onde o estudo foi conduzido e inscrito na *International Clinical Trials Registry Platform* (U1111-1123-2605) da Organização Mundial da Saúde (OMS) e no Registro Brasileiro de Ensaios Clínicos (disponível em <http://www.ensaiosclinicos.gov.br/rg/RBR-237wbg>).

O estudo foi conduzido no ambulatório de pré-natal do Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira (IMIP), localizado na cidade do Recife, nordeste do Brasil, cuja população local é abrangida pela fortificação industrial obrigatória das farinhas de trigo e de milho (4,2 mg de ferro e 150 mcg de ácido fólico em cada 100g de farinha), de acordo com regulamentação do Ministério da Saúde (Resolução - RDC nº 344, de 13 de dezembro de 2002, disponível em <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/farinha.htm>). A população de estudo constituiu-se de gestantes anêmicas, com idades entre 18 e 35 anos, estando entre a 12^a e a 32^a semanas de gravidez de baixo risco. Foram excluídas gestantes com Hb \leq 7 g/dL, histórico de hipersensibilidade ou intolerância ao sulfato ferroso, transtornos ou déficits mentais; usuárias de tabaco, álcool ou outras drogas; diagnóstico prévio de outra causa de anemia; ou indícios de infecção no momento do arrolamento.

No período de agosto de 2011 a outubro de 2012, gestantes que apresentaram, nos exames de rotina do pré-natal, valores de Hb abaixo de 11,0 g/dL foram consecutivamente incluídas no estudo, após assinatura do termo de consentimento, e foram prospectivamente submetidas à dosagem do eritrograma, da ferritina sérica e do padrão-ouro. Informações sociodemográficas (idade, raça autorreferida, município de residência, grau de escolaridade, renda familiar mensal *per capita*) e clínico-obstétricas (índice de massa copórea- IMC, número de gestações e partos anteriores, intervalo intergestacional, semanas de gestação e uso prévio de ferro oral) foram coletadas no momento do arrolamento (consulta C₀), através de questionário padronizado e exame físico, sendo registradas manuscritas em formulário padronizado. Em seguida, as gestantes foram encaminhadas para a realização dos testes hematológicos pré-tratamento. A intervenção foi iniciada em até 24 horas após a coleta desses testes e consistiu na prescrição de duas doses diárias de 40 mg de ferro elementar por 90 dias. (vide Apêndice A da tese - material suplementar do artigo)

As participantes foram reavaliadas em consultas mensais (C₁, C₂, C₃) quando foram coletadas informações sobre o tratamento, solicitadas dosagens de Hb de controle e foram checados os resultados dos exames laboratoriais no sistema informatizado de análises clínicas. O tratamento previsto de 90 dias foi interrompido nos casos de risco gestacional, parto, abandono, uso de outro tipo de suplemento de ferro, intolerância medicamentosa, cura (Hb \geq 11,0 g/dL) ou agravamento da anemia (Hb $<$ 7,0 g/dL ou queda de Hb maior que 1,0 g/dL). Informações sobre os efeitos adversos e a adesão terapêutica foram coletadas nas quatro avaliações (C₀, C₁, C₂ e C₃) com a finalidade de assegurar a ingestão da dose eficaz de ferro. Os efeitos adversos foram definidos como o aparecimento de anorexia, pirose, náuseas, vômitos, diarreia, constipação ou cólicas/dor abdominal após o início da intervenção.

A análise de acurácia dos índices eritrocitários foi realizada aplicando-se os seguintes pontos de corte recomendados pela OMS e pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) para mulheres no 2º trimestre de gestação: eritrometria $< 3,8 \cdot 10^{12}$ cel/L; Hb $< 10,5$ g/dL; HTC $< 32,0\%$; VCM $< 81,0$ fL; HCM $< 26,0$ pg; CHCM $< 32,0$ g/dL; RDW $> 14,0\%$; contagem de reticulócitos $< 1,0\%$; ferritina sérica < 12 ng/mL.^{16,39,40} Esses pontos de corte correspondem a dois desvios-padrão abaixo da média populacional de referência reportada pelo CDC.³⁹ A Hb, o HTC e a eritrometria traduzem a massa de eritrócitos circulantes e são os marcadores habitualmente utilizados para o diagnóstico de anemia.^{39,55} A morfologia dos eritrócitos (tamanho e grau de hemoglobinação) é avaliada através do VCM, da HCM, da CHCM e do RDW.^{39,55} Valores baixos de VCM, HCM e CHCM, associados a valores altos de RDW, exprimem hemácias pequenas, pálidas e com grande variabilidade de seus volumes, indicativos de anemia ferropriva na população geral.^{39,55}

Os eritogramas foram analisados utilizando-se citometria de fluxo e absorvância com o analisador hematológico automatizado ABX-Pentra DF120 do fabricante Horiba® e complementado por leitura microscópica de lâmina corada com corante panótico. O analisador automatizado empregado realiza calibração, validação e padronização automáticas de cada amostra testada. A contagem de reticulócitos foi realizada manualmente, através da leitura de esfregaço sanguíneo corado com azul brilhante de cresil, sendo expressa em percentual de eritrócitos jovens no sangue periférico que representa a atividade eritropoiética na medula óssea.^{39,55}

A ferritina, por sua vez, é uma proteína de estoque tissular de ferro mobilizável, sendo sua quantificação no soro considerada um biomarcador dos estoques corporais de ferro, dado que se correlaciona positivamente com a quantidade de ferro corável na medula óssea,^{56,57} inclusive em gestantes.^{31,34} Neste estudo, os seus valores foram obtidos em amostra de sangue venoso coletada em tubo seco e utilizando o método de quimioluminescência com equipamento ADVIA Centaur Ferritin do fabricante Bayer®, cujos limites de detecção são de 1 a 1.650 ng/mL e o intervalo de referência de 10 a 291 ng/mL. A calibração desse imunoenensaio é realizada de acordo com o 2º padrão internacional da OMS (OMS 80/578).⁵⁸

A resposta a teste terapêutico com ferro oral (padrão-ouro) foi definida, ao final do tratamento, como a presença de incremento mínimo de 0,55 desvios padrão (DP) entre os escores Z da Hb pré e pós-tratamento, após um período de pelo menos quatro semanas de seguimento e ingestão de 1.200 mg de ferro elementar (adesão mínima de 30 drágeas). Detalhes sobre o *rationale* empregado no desenvolvimento deste padrão-ouro alternativo estão publicados no protocolo do estudo.⁵⁴ Com o propósito de comprovar a relação entre a

dose administrada de ferro e a diferença entre os escores Z da Hb pré e pós-tratamento, um modelo de regressão linear testou a influência de possíveis variáveis de confusão: raça auto-referida, escolaridade, intervalo intergestacional, classificação do IMC de Atalah,⁵⁹ uso profilático de ferro anterior, valores pré-tratamento de Hb, de ferritina sérica e de leucócitos e dias em uso da intervenção do estudo. Como resultado, na amostra total de 144 gestantes, estimou-se um ganho médio de 0,0086 DP (IC95%: 0,0018-0,0154; p 0,013) nos escores-Z de Hb para cada drágea de sulfato ferroso ingerida. Verificou-se ainda que mulheres que já estavam em uso de sulfato ferroso profilático não responderam à intervenção administrada, desse modo, a regressão linear foi repetida na subamostra de 120 mulheres que não estavam em uso prévio de suplementos de ferro, encontrando o seguinte aumento médio nos escores-Z (para cada drágea ingerida): 0,0124 DP (IC95%: 0,0040-0,0207; p 0,004).

Tamanho amostral

Inicialmente, estimou-se que uma amostra de 43 casos (responsivas ao ferro) e outra de 97 não-casos (não responsivas ao ferro) seriam necessárias para se estimar sensibilidade (valor esperado de 80%) e especificidade (valor esperado de 90%) com erro relativo de 10% e confiança de 95%. Considerando que a frequência de cura de anemia em estudo prévio na mesma população de referência foi de 50%,⁶⁰ e prevendo-se 30% de possíveis perdas ou faltas de adesão terapêutica,²⁸ 278 gestantes anêmicas deveriam ser recrutadas para que se atingisse o número de casos e não-casos. Uma análise interina realizada na população de 187 gestantes recrutadas até outubro de 2012 e seguidas até dezembro de 2012 concluiu que, após 43 perdas de seguimento, o tamanho amostral de 144 seria suficiente para a obtenção das estimativas com base no padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral*, quando, então o estudo foi interrompido. Todavia, foram excluídas da análise de acurácia *a posteriori* cinco participantes que não cumpriram a adesão terapêutica mínima, resultando na amostra final de 139 gestantes anêmicas: 37 casos (ferro-responsivas) e 102 não-casos (não responsivas ao ferro).

Processamento e análise dos dados

Os dados foram digitados duplamente, processados e validados no programa Epi Info 3.5.4, e foram analisados com os programas Stata/SE 12.1 e Open Epi 2.3.1. A análise foi realizada de acordo com o desenho analítico *delayed-type cross-sectional*, tipo de estudo de validação no qual o diagnóstico definitivo da doença-alvo se baseia na ocorrência de desfechos verificados após um período de observação.⁶¹ No estudo AMA, os resultados da *resposta a teste*

terapêutico com ferro oral foram obtidos ao final do seguimento de cada gestante; desse modo, um intervalo de tempo de 28 a 90 dias decorreu entre a aferição dos testes-índice e do padrão-ouro, resultando naturalmente no cegamento e na independência entre os testes índice e padrão-ouro.

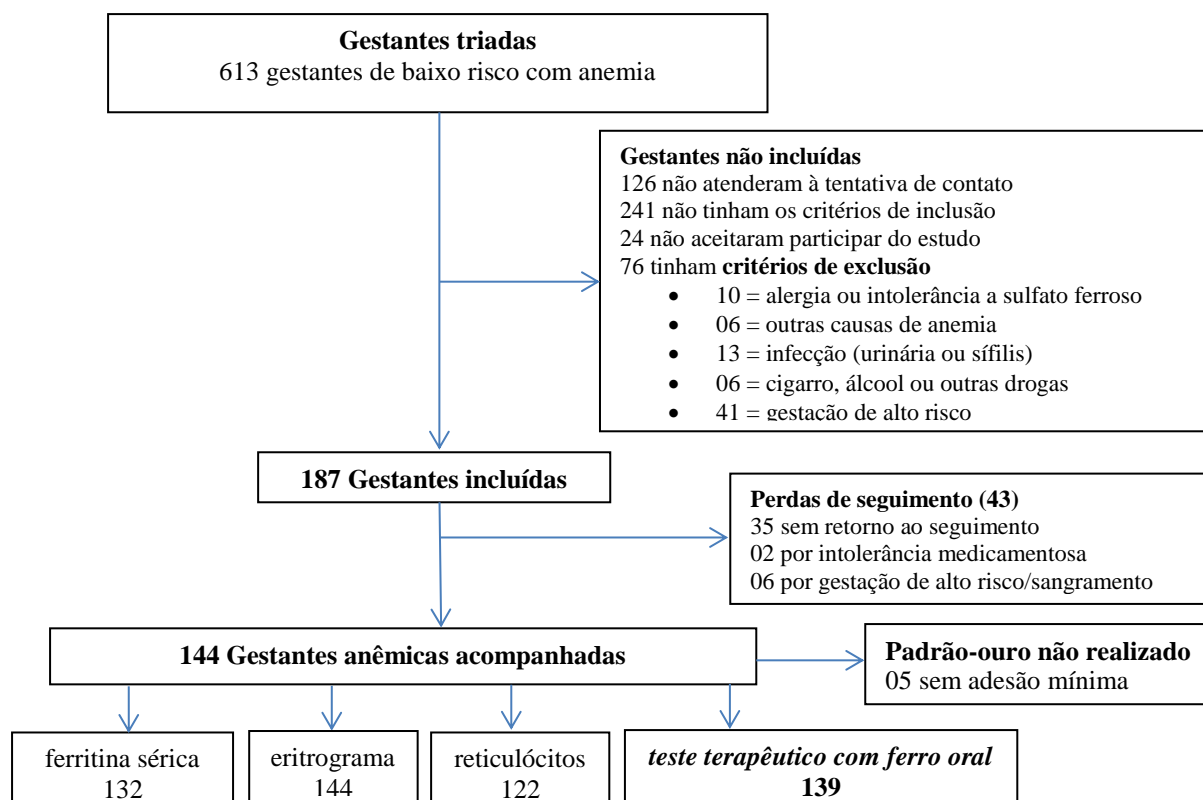
Características sociodemográficas, clínico-obstétricas, laboratoriais e relativas ao tratamento foram comparadas entre as duas amostras de casos e não-casos. As diferenças foram testadas utilizando-se os testes t de Student, do Qui-quadrado de Pearson, de Mann-Witney e exato de Fisher com um nível de significância de 5%. Estimaram-se os parâmetros de acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica (sensibilidade, especificidade, acurácia, valores preditivos, razões de verossimilhança, área sob a curva *ROC*, teste *kappa* e *Odds Ratio* diagnóstica) e seus respectivos intervalos de confiança de 95%, para o diagnóstico terapêutico da deficiência funcional de ferro, de acordo com o padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral*.

Tendo em vista a assimetria positiva dos resultados da ferritina sérica, os seus valores foram submetidos a uma transformação logarítmica para que se obtivesse uma distribuição mais simétrica. No entanto, a curva *ROC* utilizando-se os logaritmos de seus valores resultou em área sob a curva igual à encontrada com os valores não log-transformados.

Resultados

Caracterização da amostra

Entre agosto de 2011 e outubro de 2012, foram triadas, através do sistema informatizado do laboratório de análises clínicas do IMIP, 613 gestantes de baixo risco com anemia, das quais 126 não responderam à tentativa de contato da equipe de pesquisa. Das mulheres contatadas, 246 tinham idade entre 18 e 35 anos e estavam com 12 a 32 semanas de gestação. Dentre estas, 24 mulheres não aceitaram participar da pesquisa e 35 apresentavam critérios de exclusão: urocultura positiva (n 10), sorologia para sífilis reagente (n 3), passado de alergia ou intolerância ao sulfato ferroso (n 10); outras causas de anemia (n 6); uso de cigarro, álcool ou drogas (n 6). De 187 gestantes incluídas no estudo, houve 43 perdas de seguimento e cinco retiradas da análise devido à falta de adesão mínima, resultando em 25,7% de perdas (48/187) e nos dois grupos finais de comparação: 37 casos (mulheres ferro-responsivas) e 102 não-casos (mulheres não responsivas ao ferro). (Fluxograma)



Fluxograma – Inclusões, perdas e falhas na realização dos testes-índice e do padrão-ouro entre as gestantes triadas para o estudo AMA entre agosto de 2011 e outubro de 2012.

As características das participantes de acordo com a presença ou não de deficiência funcional de ferro estão representadas na Tabela 1. As gestantes foram procedentes da Região metropolitana do Recife, exceto seis que residiam em municípios rurais. A metade de ambos os grupos era de nulíparas, não havendo diferenças significativas quanto à mediana de número de gestações ($p = 0,708$) e partos anteriores ($p = 0,773$). As demais características sociodemográficas e clínico-obstétricas também não diferiram entre os grupos, destacando-se que apenas 23 mulheres já estavam em uso de suplementos de ferro diariamente a mais de um mês, sendo que o percentual dessas mulheres entre os dois grupos não foi significativamente distinto.

As características laboratoriais pré-tratamento mostraram algumas diferenças. As médias dos valores de Hb e de seus escores Z foram significativamente mais baixas no grupo que respondeu ao tratamento; assim como a mediana dos valores de ferritina sérica tendeu a ser mais baixa nesse grupo, no entanto, sem significância estatística. Quanto às características da intervenção, as mulheres não responsivas foram tratadas por mais tempo e com maiores montantes de drágeas de ferro, sendo que mais de 90% das gestantes em ambos os grupos ingeriram pelo menos 1.800 mg de ferro elementar até o término do seguimento.

Tabela 1. Características sociodemográficas, clínico-obstétricas, laboratoriais e da intervenção, comparadas de acordo com a resposta a teste terapêutico com ferro oral em 139 mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação. CAM-IMIP, Recife. 2011/2012.

	Classificação		p
	Ferro-responsivas (n 37)*	Não responsivas (n 102)	
Características sócio-demográficas, clínicas e laboratoriais no arrolamento			
Média de idade	26,3 ± 5,0	25,5 ± 4,7	0,387 ¹
Percentual da raça autorreferida			0,784 ²
Parda	62,2 (23/37)	52,9 (54/102)	
Negra	16,2 (6/37)	19,6 (20/102)	
Branca	16,2 (6/37)	18,6 (19/102)	
Outras	5,4 (2/37)	8,8 (9/102)	
Percentual da classificação do IMC por Atalah**			0,094 ²
Baixo peso	16,2 (6/37)	20,8 (21/101)	
Peso adequado	64,8 (24/37)	46,5 (47/101)	
Sobrepeso	5,4 (2/37)	21,8 (22/101)	
Obesidade	13,5 (5/37)	10,9 (11/101)	
Percentual dos graus de escolaridade			0,255 ²
1º grau incompleto	2,7 (1/37)	3,9 (4/102)	
1º grau completo	70,3 (26/37)	56,9 (58/102)	
2º grau completo	27,0 (10/37)	31,4 (32/102)	
Superior completo	0,0 (0/37)	7,8 (8/102)	
Mediana da renda familiar <i>per capita</i> (Reais)	333,33 (n 37) IQR 200,00	350,00 (n 101) IQR 304,50	0,987 ³
Mediana do intervalo intergestacional (meses)	71,0 (n 16) IQR 46,4	59,0 (n 43) IQR 40,1	0,720 ³
Média da idade gestacional (semanas)	23,2 ± 5,2	23,7 ± 4,6	0,561 ¹
Frequência de gestantes usando ferro há 1 mês ou mais	8,1 (3/37)	19,6 (20/102)	0,083 ⁴
Média da Hb (g/dL)	10,1 ± 0,76	10,4 ± 0,58	0,018 ¹
Média do escore Z de Hb (unidades de DP)	-1,8 ± 0,81	-1,4 ± 0,67	0,005 ¹
Mediana da ferritina pré-tratamento (ng/mL)	19,0 (n 35) IQR 24,0	28,7 (n 97) IQR 41,9	0,060 ³
Características da intervenção ao longo do estudo			
Média da idade gestacional no início do tratamento	21,6 ± 5,6	23,1 ± 4,6	0,121 ¹
Média de dias em tratamento	52,6 ± 26,4	64,0 ± 26,1	0,025 ¹
Percentuais de doses totais de ferro ingerido			0,046 ²
1200 – 1760 mg	5,4 (2/37)	9,8 (10/102)	
1800 - 2400 mg	43,2 (16/37)	21,6 (22/102)	
> 2400 mg	51,4 (19/37)	68,6 (70/102)	

DP: desvio-padrão | IMC: índice de massa corpórea | IQR: intervalo interquartil.

*Entre as mulheres não responsivas, uma participante não tinha dados sobre a renda familiar mensal e outra sobre a classificação de Atalah. **Atalah *et al* 1997.

¹Teste t de Student; ²Teste do Qui-quadrado de Pearson; ³Teste de Mann-Witney; ⁴Teste exato de Fisher;

Estimativas de acurácia para prever a resposta à ferroterapia

Os resultados de eritrograma pré-tratamento foram obtidos de todas as participantes, no entanto, devido a problemas operacionais do laboratório de análises clínicas, 17 não tiveram o exame de contagem de reticulócitos realizado ou tiveram o material perdido, ocorrendo o mesmo com a dosagem sérica da ferritina em sete observações. Os números de resultados perdidos ou não realizados dos testes-índice estão apresentados na Tabela 2. Quanto ao padrão-ouro, cinco observações não puderam ser analisadas ao final do seguimento (número não representado na Tabela 2), devido a não ingestão da dose mínima considerada eficaz.

Tabela 2. Distribuição dos resultados dos índices eritrocitários e da ferritina sérica em relação ao padrão-ouro (*resposta a teste terapêutico com ferro oral*) para o diagnóstico de deficiência funcional de ferro em 139 mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação. CAM-IMIP, Recife. 2011/2012.

Testes diagnósticos	Deficiência de ferro		Total
	Presente (ferro-responsivas)	Ausente (não responsivas)	
Eritrometria			
Positiva (< 3,8 10 ¹² cells/L)	32	79	111
Negativa	05	23	28
Total	37	102	139
Hemoglobina			
Positiva (< 10,5 g/dL)	20	48	68
Negativa	17	54	71
Total	37	102	139
Hematócrito			
Positivo (< 32,0 %)	22	54	76
Negativo	15	48	63
Total	37	102	139
VCM			
Positivo (< 81,0 fL)	07	14	21
Negativo	30	88	118
Total	37	102	139
HCM			
Positiva (< 26,0 pg)	07	13	20
Negativa	30	89	119
Total	37	102	139
CHCM			
Positiva (< 32,0 g/dL)	12	17	29
Negativa	25	85	110
Total	37	102	139
RDW			
Positivo (14,0 %)	08	25	33
Negativo	29	77	106
Total	37	102	139
Contagem de reticulócitos			
Positiva (< 1,0 %)	02	05	07
Perdidos ou não realizados	02	15	17
Negativa	33	82	115
Total	37	102	139
Ferritina sérica			
Positiva (< 12,0 ng/mL)	12	25	37
Perdidos ou não realizados	02	05	07
Negativa	23	72	95
Total	37	102	139

VCM (volume corpuscular médio) | HCM (hemoglobina corpuscular média) | CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) | RDW (*red blood cells distribution width*).

A Tabela 3 apresenta os parâmetros de acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica. A contagem de eritrócitos maduros (eritrometria) obteve sensibilidade de quase 90%, todavia com baixa especificidade (20%); enquanto o contrário foi observado com a contagem de eritrócitos jovens (reticulócitos) que apresentou baixa sensibilidade (5%) e especificidade acima de 90%. Os indicadores de massa eritrocitária (Hb e HTC) apresentaram sensibilidade e especificidade em torno de 50%. A dosagem de ferritina sérica e todos os índices morfológicos (VCM, HCM, CHCM, *RDW*) apresentaram, no geral, sensibilidades em torno ou abaixo de 30%, com especificidades superiores a 70%. Todos os testes avaliados apresentaram valores preditivos negativos acima de 70% e valores preditivos positivos em torno de 35%.

Tabela 3. Estimativas de acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica para prever o diagnóstico de deficiência funcional de ferro, de acordo com o padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral* em 139 mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação. CAM-IMIP, Recife. 2011/2012.

Teste	Sensibilidade	Especificidade	Valor preditivo +	Valor preditivo -
	% (IC)*	% (IC)	% (IC)	% (IC)
Eritrometria ($< 3,8 \cdot 10^{12}$ cel/L)	86,5 (72,0;94,1)	22,5 (15,5;31,6)	28,8 (21,2;37,8)	82,1 (64,4;92,1)
HTC ($< 32,0$ %)	59,5 (43,5;73,6)	47,1 (37,7;56,7)	28,9 (19,9;36,9)	76,2 (64,4;85,0)
Hb ($< 10,5$ g/dL)	54,0 (38,4;68,9)	52,9 (43,3;68,9)	29,4 (19,9;41,1)	76,1 (64,9;84,5)
VCM ($< 81,0$ fL)	18,9 (9,5;34,2)	86,3 (78,2;91,6)	33,3 (17,2;54,6)	74,6 (66,0;81,6)
HCM ($< 26,0$ pg)	18,9 (9,5;34,2)	87,2 (79,4;92,4)	35,0 (18,1;56,7)	74,8 (66,3;81,7)
CHCM ($< 32,0$ g/dL)	32,4 (19,6;48,5)	83,3 (74,9;89,3)	41,4 (25,5;59,3)	77,3 (68,6;84,1)
<i>RDW</i> ($> 14,0$ %)	21,6 (11,4;37,2)	75,5 (66,3;82,8)	24,2 (12,8;41,0)	72,6 (63,5;80,2)
Reticulócitos (n=122) ($< 1,0$ %)	5,7 (1,58;18,6)	94,2 (87,2;97,5)	28,6 (8,2;64,1)	71,3 (62,4;78,8)
Ferritina (n=132) ($< 12,0$ ng/mL)	34,3 (20,8;50,8)	74,2 (64,7;81,9)	32,4 (19,6;48,5)	75,8 (66,3;83,3)

* intervalo de confiança de 95%

HTC (hematócrito) | Hb (concentração de hemoglobina) | VCM (volume corpuscular médio) | HCM (hemoglobina corpuscular média) | CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) | *RDW* (*red blood cells distribution width*).

Estimativas de acurácia para discriminar gestantes responsivas e não responsivas à ferroterapia

Ambas as razões de verossimilhança, positivas e negativas, apresentaram valores muito próximos de 1,0. As razões de verossimilhança positivas situaram-se pouco acima das negativas, resultando em valores de *Odds Ratio* diagnósticas (razões entre essas medidas) pouco acima de 1,0; exceto para o *RDW* e a contagem de reticulócitos, cujas razões foram inversas, como pode ser observado na Tabela 4.

As acurácias diagnósticas de todos os parâmetros estudados situaram-se entre 39,6% (IC95% 31,8 a 47,9), para eritrometria, e 69,8% (IC95% 61,7 a 76,8), para CHCM. A área sob a curva *ROC* da ferritina sérica foi de 0,61 (IC95% 0,50 a 0,71) e dos índices eritrocitários variaram de 0,51 (IC95% 0,40 a 0,62), para eritrometria, VCM e *RDW*, a 0,64 (IC95% 0,54 a 0,74), para CHCM.

Tabela 4. Estimativas de acurácia diagnóstica dos índices eritrocitários e da ferritina sérica para discriminar a deficiência funcional de ferro, de acordo com o padrão-ouro *resposta a teste terapêutico com ferro oral* em 139 mulheres no 2º e 3º trimestres de gestação. CAM-IMIP, Recife. 2011/2012.

Teste (n)	RVS* +	RVS* –	Odds diagnóstica
	Razão (IC)	Razão (IC)	Razão (IC)
Eritrometria ($< 3,8 \cdot 10^{12}$ cel/L)	1,12 (1,08;1,16)	0,60 (0,30;1,19)	1,86 (0,65;5,33)
HTC ($< 32,0$ %)	1,12 (1,02;1,24)	0,86 (0,72;1,03)	1,30 (0,61;2,80)
Hb ($< 10,5$ g/dL)	1,15 (1,01;1,30)	0,87 (0,75;1,01)	1,15 (0,62;2,81)
VCM ($< 81,0$ fL)	1,38 (0,36;5,26)	0,94 (0,88;1,01)	1,47 (0,54;3,98)
HCM ($< 26,0$ pg)	1,48 (0,38;5,73)	0,93 (0,87;0,99)	1,60 (0,58;4,38)
CHCM ($< 32,0$ g/dL)	1,95 (1,23;3,07)	0,81 (0,75;0,88)	2,40 (1,01;5,69)
<i>RDW</i> ($> 14,0$ %)	0,88 (0,34;2,32)	1,04 (0,96;1,12)	0,85 (0,34;2,10)
Reticulócitos (n=122) ($< 1,0$ %)	0,99 (0,20;4,89)	1,00 (0,91;1,10)	0,99 (0,18;5,38)
Ferritina (n=132) ($< 12,0$ ng/mL)	1,33 (0,90;1,97)	0,88 (0,80;1,97)	1,50 (0,65;3,46)

*razão de verossimilhança

HTC (hematócrito) | Hb (concentração de hemoglobina) | VCM (volume corpuscular médio) | HCM (hemoglobina corpuscular média) | CHCM (concentração de hemoglobina corpuscular média) | *RDW* (*red blood cells distribution width*).

A concordância entre cada teste e o padrão-ouro mostrou-se fraca de acordo com os valores dos testes *kappa* na classificação de Landis e Koch,⁶² como se segue: eritrograma = 0,55 (IC95% -0,03 a 0,15); HTC = 0,05 (IC95% -0,09 a 0,19); Hb = 0,55 (IC95% -0,09 a 0,20); VCM = 0,06 (IC95% -0,10 a 0,22); HCM = 0,07 (IC95% -0,08 a 0,23); CHCM = 0,17 (IC95% 0,00 a 0,33); RDW = -0,03 (IC95% -0,19 a 0,14); contagem de reticulócitos = 0,00 (IC95% -0,12 a 0,12); ferritina = 0,08 (IC95% -0,09 a 0,25).

Discussão

Na população estudada de gestantes anêmicas de baixo risco, os pontos de corte atualmente empregados para os níveis séricos de ferritina e para as características dos glóbulos vermelhos avaliadas em sangue periférico apresentaram baixos valores preditivos positivos (VPP) acompanhados de altos valores preditivos negativos (VPN). As razões de verossimilhança positivas (RVS+) e negativas (RVS-) não se distanciaram e, conseqüentemente, as *Odds Ratio* diagnósticas (RVS+:RVS-) não tiveram peso informativo. A ferritina, os índices morfológicos automatizados e a contagem manual de reticulócitos apresentaram altas especificidades com sensibilidades baixas; enquanto o contrário foi observado com a contagem automatizada de eritrócitos maduros. A Hb e o HTC, por sua vez, detectaram apenas metade das gestantes ferro-responsivas e não responsivas. Em geral, todos os testes apresentaram baixos percentuais de acurácia diagnóstica e áreas sob as curvas *ROC* (ASC) entre 0,5 e 0,6, indicando, respectivamente, uma alta proporção de erros de classificação diagnóstica e a ausência de pontos de corte alternativos com sensibilidade e especificidade simultaneamente superiores a 50-60%.⁶³

A avaliação da massa eritrocitária (eritrometria, Hb, HTC) e da morfologia dos eritrócitos (VCM, HCM, CHCM e RDW) já havia mostrado acurácias igualmente baixas em outros poucos estudos de validação na gestação, utilizando a ferritina sérica como padrão-ouro.³¹⁻³⁷ De modo geral, nesses estudos, a Hb e o HTC apresentaram sensibilidade e especificidade em torno de 60% ou abaixo; enquanto os índices morfológicos atingiram especificidades acima de 70% associadas a sensibilidades abaixo de 40%.³¹⁻³⁷ Há escassez de estudos de validação que tenham estimado as curvas *ROC* desses parâmetros na gestação. No estudo de Tam *et al* (1999), dentre outros índices, a Hb apresentou a melhor área sob a curva *ROC* (0,78) para identificar gestantes com ferritina sérica < 20 ng/mL.³⁵ Similarmente, Casanova *et al* (2005) encontraram curvas *ROC* dos índices eritrocitários com áreas entre 0,6 e 0,7 *versus* o critério da ferritina sérica < 10 ng/mL.³⁷

Poucos pesquisadores compararam biomarcadores dos estoques de ferro e índices eritrocitários com o conteúdo de ferro medular em gestantes.^{31,34} Puolakka *et al* (1980) verificaram que, entre 70 gestantes não anêmicas na segunda metade da gestação, a Hb não se correlacionou com o ferro corável na medula óssea e encontraram sensibilidades de 12% para CHCM, 40% para ferro sérico, 48% para a saturação da transferrina e 72% para a ferritina sérica (< 35 ng/mL).³¹ Esses resultados devem ser vistos com cautela, pois o estudo ocorreu antes da padronização internacional das ferritinas humanas para imunoenaios. Posteriormente, van den Broek *et al* (1998) compararam VCM, ferro sérico, zincoprotoporfirina, ferritina sérica, transferrina, saturação da transferrina, capacidade de ligação da transferrina e receptor solúvel da transferrina com a ausência de ferro corável na medula óssea entre 93 africanas anêmicas no 2º e 3º trimestres de gestação. A ferritina apresentou a melhor acurácia, mesmo quando comparada a modelos de múltiplos biomarcadores. O ponto de corte de 12 ng/mL rendeu sensibilidade de 37% e especificidade de 93% e o ponto de corte alternativo de 30 ng/mL, selecionado com base na curva *ROC*, resultou em sensibilidade de 90%, especificidade de 85% e RVS+ de 6,0. No entanto, metade das gestantes estudadas por estes últimos autores era portadora de HIV e um terço, de talassemia, levando-os a recomendar que as faixas normais da ferritina devem ser cuidadosamente estabelecidas em outros grupos populacionais.³⁴

Para a interpretação dos resultados do presente estudo e comparação com os achados de outros autores, é fundamental destacar que o padrão-ouro adotado no protocolo AMA foi um desfecho terapêutico e não um teste laboratorial de referência convencional. Essa abordagem visou resgatar o caráter funcional da definição de anemia ferropriva, através do diagnóstico da avidez pelo ferro, em detrimento da definição estatística baseada em pontos de corte de marcadores laboratoriais da doença. Além disso, diferindo do tradicional conceito de acurácia focado apenas na identificação da presença ou ausência da doença, o conceito de diagnóstico terapêutico imprimiu uma lógica pragmática à interpretação desses resultados, desde que se ocupou da identificação de gestantes anêmicas que tiveram sucesso hematológico com a ferroterapia no contexto do seu cuidado pré-natal rotineiro. Nessas perspectivas, a mensuração de Hb, HTC e de ferritina sérica não foram capazes de prever a presença de avidez por ferro na população avaliada. Além disso, caso a decisão de tratar fosse baseada nos pontos de corte de HTC ou de Hb recomendados para o 2º trimestre de gravidez,^{16,39,40} metade das gestantes anêmicas da amostra seria manejada equivocadamente.

Em suma, a acurácia dos índices eritrocitários sob a lógica funcional revelou-se tão baixa quanto o observado nos estudos de validação convencionais. Por sua vez, em desacordo

com os estudos precedentes, a ferritina sérica, no seu ponto de corte recomendado de 12 ng/mL, não se mostrou superior aos índices eritrocitários para predizer ou discriminar a presença da deficiência de ferro, apresentando sensibilidade surpreendentemente baixa e curvas *ROC* indicando a ausência de pontos de corte que possam atingir acurácia diagnóstica próxima à encontrada por outros autores.^{31,34} Mesmo um ponto de corte ótimo da ferritina, classificaria corretamente apenas 60% das gestantes dessa população, quanto à necessidade de ferro. Esse achado pode ser explicado pelo fato da ferritina sérica representar o compartimento de ferro estocado na medula óssea e não traduzir o compartimento de ferro mobilizável.⁴⁹ Sendo assim, a interferência da homeostase gravídica na eritropoiese, na utilização do ferro e no volume plasmático podem resultar em pobre correlação dos valores séricos da ferritina com o ferro corporal mobilizável, e, portanto, com a presença de deficiência funcional de ferro.^{41,43,44,50-52}

O teste que identificou o maior percentual de gestantes ferro-responsivas (sensibilidade) foi a contagem de glóbulos vermelhos maduros, indicando que a eritrometria seria o teste de *screening* mais adequado para a recomendação de reposição de ferro em gestantes anêmicas da nossa localidade. É possível que esse achado esteja relacionado à longa meia vida dos eritrócitos (120 dias),⁶⁴ que permite que estes não sejam precocemente influenciados pelas alterações na produção eritróide provocadas pela gravidez e que possam, portanto refletir a eritropoiese pré-gravídica.^{47,48} Por sua vez, a contagem de eritrócitos jovens (reticulócitos) teve o maior percentual de resultados normais entre as gestantes não responsivas (especificidade), no entanto, a confiabilidade desse achado é duvidosa, dado que o teste não foi realizado na amostra total e foi mensurado manualmente por único leitor. Portanto, viés de aferição pode ter levado ao pequeno número de resultados positivos e, conseqüentemente, à alta especificidade devido à predominância dos resultados negativos do teste e do padrão-ouro. Não podemos, portanto, fazer recomendações pragmáticas sobre o uso da contagem de reticulócitos com base nesses dados.

Tomando-se os percentuais amostrais de gestantes ferro-responsivas (27%) e não responsivas (73%), respectivamente, como as probabilidades pré-teste da presença ou ausência de deficiência funcional de ferro, observa-se que um dado resultado positivo ou negativo de qualquer dos testes estudados acrescentou pouca informação diagnóstica.⁶¹ Os valores preditivos positivos (probabilidades pós-teste da doença) e negativos (probabilidades pós-teste da não-doença) foram todos próximos aos percentuais pré-teste. Por sua vez, todos os testes apresentaram um baixo poder para discriminar gestantes responsivas ou não ao ferro, dado que as curvas *ROC* ficaram na faixa considerada pouco acurada ($0,5 > ASC \leq 0,7$).⁶³

Apenas 50-60% das gestantes seriam corretamente classificadas caso fossem utilizados pontos de corte ótimos com base nessas curvas *ROC*.^{61,63}

De uma maneira geral, a CHCM foi o teste que apresentou as melhores estimativas de predição e discriminação da necessidade de ferro. Resultados positivos da CHCM foram quase duas vezes mais frequentes em gestantes ferro-responsivas ($RVS+ = 1,95$), a *Odds Ratio* diagnóstica situou-se acima de 2,0 e a ASC foi a mais elevada (0,64). Nenhum outro teste apresentou razoável evidência em favor da doença ($RVS+ > 2,0$) ou contra a doença ($RVS- < 0,5$), resultando, conseqüentemente em *Odds Ratio* diagnósticas ($RVS+:RVS-$) também pouco informativas ($< 2,0$).⁶¹ É possível que esses resultados estejam expressando, não só as distorções que a hemodiluição gravídica pode provocar na avaliação dos índices de massa eritrocitária (Hb, HTC e eritrometria), mas também um outro fator de confusão relacionado ao surgimento de células jovens no sangue periférico decorrente da “eritropoiese emergencial” da gravidez,^{47,48} que incide particularmente sobre os valores de VCM, *RDW* e reticulócitos.⁶⁴

O melhor desempenho da CHCM, a despeito de sua conhecida queda fisiológica,^{43,45} poderia estar representando uma melhor relação com a presença da deficiência funcional de ferro nas gestantes. É possível que, a hemoglobina celular, diferentemente da sua concentração sanguínea, seja menos influenciada pela hemodiluição e mais correlacionada à taxa metabólica de utilização do ferro corporal e ao montante de ferro mobilizável. No entanto, os valores encontrados de sensibilidade, especificidade e valores preditivos não foram muito diferentes dos outros índices morfológicos, indicando que, apesar do melhor poder informativo do resultado positivo em relação ao negativo, e vice-versa, a sua mensuração não foi capaz de detectar mais casos e não-casos que os demais testes.

Por fim, os valores de *kappa* apontam que os testes e o padrão-ouro apresentaram concordâncias pobres ($kappa = 0,00-0,19$) ou fracas ($kappa = 0,20-0,39$).⁶² No entanto, a utilização da estatística *kappa* para estimar a concordância entre dois testes binários feitos no mesmo sujeito é passível de resultados paradoxais quando é aplicado um padrão-ouro falso, pois o grau de concordância não indica em qual extensão cada teste classifica corretamente doença e não-doença.⁶⁵ Essa observação é de particular importância nessa discussão, dado que, pela ausência de um padrão-ouro ideal para o diagnóstico de deficiência funcional de ferro materna, foi adotado neste estudo um teste terapêutico com ferro oral como padrão de referência alternativo, partindo-se do pressuposto de que o aumento na Hb seria um indicador confiável da presença de deficiência de ferro como causa isolada da anemia.^{16,30} Esta é a principal fragilidade metodológica do estudo, tendo em vista a escassez de evidências

empíricas sobre a confiabilidade e a magnitude do efeito dose-dependente do ferro oral durante a gestação, quando o fenômeno da hemodiluição atua como importante fator de confusão.³⁸

Considerando esse problema, no estudo AMA, as análises do efeito terapêutico, a ser aferido através da variação nos valores de Hb, aplicaram a metodologia dos escores Z de Hb, desenvolvida pelos autores Beaton e McCabe.³⁸ Os escores Z ajustam os valores observados de Hb, com relação à média esperada para a semana gestacional, com base em uma curva de referência externa de gestantes suplementadas com ferro.³⁸ Essa abordagem visou controlar uma série de variáveis não mensuráveis entre as participantes em diferentes fases da gestação, tais como, a diversidade na ingestão dietética de ferro, nas causas da anemia e no *status* hematológico das mulheres; além de corrigir as variações não terapêuticas da Hb, decorrentes de modificações fisiológicas ao longo do período de seguimento de cada gestante.³⁸

Adicionalmente, a regressão linear realizada na amostra, para demonstrar o efeito dose-dependente do ferro oral nos escores Z de Hb, comprovou que a média das diferenças pós-pré-tratamento se correlacionou positiva e independentemente com o número de drágeas ingeridas e mostrou que o efeito médio esperado após a ingestão de 30 drágeas de sulfato ferroso (adesão mínima) seria de 0,24 escores Z ($0,0086 \times 30$). Desse modo, esse achado não esteve de acordo com o critério pré-estabelecido para definição de caso (resposta terapêutica $\geq 0,55$ escores Z). Diante disso, as análises de acurácia da Hb e da ferritina sérica foram repetidas, utilizando-se os critérios $\geq 0,20$ e $\geq 0,30$ escores Z (resultados não apresentados) e foram obtidos resultados muito similares para todos os parâmetros de acurácia. Sendo assim, os resultados foram aqui apresentados como estabelecidos *a priori* no protocolo do estudo AMA publicado previamente.⁵⁴

Em consonância com essas observações, uma metanálise estudou especificamente a magnitude da resposta hematológica do ferro oral em gestantes de países em desenvolvimento e comprovou o efeito dose-dependente.⁶⁶ Os autores concluíram que a suplementação diária por até 10 semanas provoca, no geral, um aumento de 0,84 g/dL na Hb e que o efeito do uso diário de até 60 mg de ferro aumentou em 0,41 a Hb, ocorrendo um menor efeito em gestantes com valores iniciais de Hb mais altos.⁶⁶ Esses autores controlaram o efeito através de ajuste para a alteração esperada nos grupos controle, mas não ajustaram para a hemodiluição gravídica ou para os estoques de ferro pré-tratamento. Outra metanálise recente de ensaios clínicos na população geral demonstrou que indivíduos em uso de ferro diário apresentaram aumentos médios de 0,5 g/dL na Hb, independente do tempo de tratamento, que variou de 2 a

72 semanas; no entanto, esse efeito se reduziu em 0,08 g/dL para cada 10 ng/mL de ferritina sérica na linha de base.⁶⁷

Apesar da amostra pouco menor que a pré-estabelecida ser um ponto de crítica para este estudo, juntamente com o percentual de perdas, as estimativas de acurácia mostraram-se precisas e o critério utilizado como padrão-ouro apresentou boa robustez no modelo de regressão linear. O criticismo quanto ao curto prazo de tratamento estabelecido para mensurar o desfecho foi abordado incluindo-se o tempo de tratamento como variável controle no modelo de regressão sem que o efeito terapêutico fosse alterado significativamente. Pode-se dizer que a mais importante restrição dos resultados do estudo se dá pela impossibilidade de comparação com a literatura. Em uma série de bases de dados (MEDLINE, SCIELO, LILACS, Cochrane, Embase), apenas um estudo com mulheres não grávidas em idade fértil, vivendo em grandes altitudes,⁶⁸ e dois estudos na população infantil validaram valores pré-tratamento de testes hematológicos de acordo com a resposta à ferroterapia.^{69,70}

Contudo, o estudo atual, ao utilizar a resposta à ferroterapia como padrão-ouro, apresenta uma forma funcional de pensar a anemia e a deficiência de ferro durante a gravidez, levando em consideração as intensas e dinâmicas modificações do *status* hematológico nesse período do ciclo de vida, e agrega ao conhecimento atual o caráter pragmático do diagnóstico da anemia materna ferro-responsiva. Enfim, os achados permitem questionar o uso da Hb e do HTC, em pontos de corte estáticos estabelecidos conforme a definição Gaussiana da normalidade, como critérios para tomada de decisões clínicas ou populacionais.¹⁶

Conclusões

Na prática clínica da assistência pré-natal, os valores dos índices eritrocitários e dos níveis séricos de ferritina não são capazes de predizer a resposta à ferroterapia em gestantes anêmicas, assim como não diferenciam gestantes anêmicas ferro-suficientes e ferro-deficientes. O teste terapêutico com ferro oral por curto prazo (quatro semanas) é uma ferramenta de baixo custo que pode ser utilizada para o manejo rotineiro mais eficaz dos casos de anemia materna. Incentivo deve ser dado para o desenvolvimento e validação de testes diagnósticos mais confiáveis para a anemia ferropriva materna.

Conflitos de interesse

A pesquisa recebeu financiamento da agência governamental Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Os autores declaram não haver conflitos de interesse financeiros ou de outra natureza relacionados a esse trabalho.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Debora Bresani Salvi pelo sua dedicação e competência na coordenação do trabalho de campo, a Adriana Afonso Ferreira (assistente de pesquisa) pelo auxílio no recrutamento das gestantes, a Mércia Cristina Batista Veras (chefe da Farmácia do IMIP) por seu empenho na guarda e fornecimento da medicação; a Maria do Rosário Soares de Almeida Lelis de Moura, Jacqueline Barros Palmerston, Waldylene Barbosa Calabria e Flávia Angélica Santos de Araújo pelo fundamental apoio do setor do laboratório de análises clínicas do IMIP e, por fim, a Dra Ana Laura Ferreira Gomes (chefe do ambulatório de saúde da mulher do IMIP) pelo acolhimento da equipe de pesquisa no serviço de pré-natal.

Referências

1. Garn SM, Ridella SA, Petzold AS, Falkner F. Maternal hematologic levels and pregnancy outcomes. *Semin Perinatol.* 1981;5(2):155-62.
2. Murphy JF, O'Riordan J, Newcombe RG, Coles EC, Pearson JF. Relation of haemoglobin levels in first and second trimesters to outcome of pregnancy. *Lancet.* 1986;992-5.
3. Scholl TO, Hediger ML, Fisher RL, Shearer JW. Anemia vs iron deficiency: increase risk of preterm delivery in a prospective study. *Am J Clin Nutr.* 1992;55:985-8.
4. Steer P, Alam MA, Wadsworth J, Welch A. Relation between maternal haemoglobin concentration and birth weight in different ethnic groups. *Br Med J.* 1995;310:489-91.
5. Allen LH. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. *Am J Clin Nutr.* 2000;71 Suppl:S1280-4.
6. Scholl TO, Reilly T. Anemia, iron and pregnancy outcome. *J Nutr.* 2000;130(2):443.
7. Yip R. Significance of an abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2000;72 Suppl:S272-9.
8. Rasmussen KM. Iron deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Is there a causal relationship between iron deficiency or iron-

- deficiency anemia and weight at birth, length of gestation and perinatal mortality? *J Nutr.* 2001;131 Suppl:S590-603.
9. Ronnenberg AG, Wood RJ, Wang X, Xing H, Chen C, Chen D, et al. Preconception hemoglobin and ferritin concentrations are associated with pregnancy outcome in a prospective cohort of chinese women. *J Nutr.* 2004;134:2586-91.
 10. Shobeiri F, Begum K, Nazari M. A prospective study of maternal hemoglobin status of Indian women during pregnancy and pregnancy outcome. *Nutr Res.* 2006;(26):209-13.
 11. Rush D. Nutrition and maternal mortality in the developing world. *Am J Clin Nutr.* 2000;72 Suppl:S212-40.
 12. Brabin BJ, Hakimi M, Pelletier D. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. *J Nutr.* 2001;131 Suppl: S604-15.
 13. Little MP, Brocard P, Elliott P, Steer PJ. Hemoglobin concentration in pregnancy and perinatal mortality: a London-based cohort study. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:220-6.
 14. World Health Organization. Control of nutritional anaemia with special reference to iron deficiency. WHO (Geneva); 1975. WHO Technical Report Series no. 580. http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_580.pdf
 15. United Nations Children's Fund/World Health Organization. Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children. UNICEF/WHO (Geneva); 1999. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/UNICEF_WHO_ida_consultation_report.pdf
 16. World Health Organization. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control – a guide for programme managers. WHO (Geneva); 2001. http://www.who.int/nutrition/publications/micronutrients/anaemia_iron_deficiency/WHO_NHD_01.3/en/index.html
 17. Stoltzfus RJ. Iron deficiency: global prevalence and consequences. *Food Nutr Bull.* 2003;24 Suppl 4:S99-103.
 18. World Health Organization. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. WHO (Geneva); 2008. http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf
 19. Ekström ECM, Kavishe FP, Habicht JP, Frongillo EA Jr, Rasmussen KM, Hemed L. Adherence to iron supplementation during pregnancy in Tanzania: determinants and hematologic consequences. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:368–74.

20. Ekström EC, Hyder SM, Chowdhury AM, Chowdhury SA, Lönnerdal B, Habicht JP, et al. Efficacy and trial effectiveness of weekly and daily iron supplementation among pregnant women in rural Bangladesh: disentangling the issues. *Am J Clin Nutr.* 2002;76:1392–1400.
21. Hyder SM, Persson LA, Chowdhury AM, Ekström EC. Do side-effects reduce compliance to iron supplementation? A study of daily- and weekly-dose regimens in pregnancy. *J Health Popul Nutr.* 2002;20:175-9.
22. Makrides M, Crowther CA, Gibson RA, Gibson RS, Skeaff CM. Efficacy and tolerability of low-dose iron supplements during pregnancy: a randomized controlled trial. *Am J Nutr.* 2003;78:145–53.
23. Kumar A, Jain S, Singh NP, Singh T. Oral versus high dose parenteral iron supplementation in pregnancy. *Int J Gynecol Obstet.* 2005;89:7–13.
24. Saha L, Pandhi P, Gopalan S, Malhotra S, Saha PK. Comparison of efficacy, tolerability, and cost of iron polymaltose complex with ferrous sulphate in the treatment of iron deficiency anaemia in pregnant women. *Med Gen Med.* 2007;9:1.
25. Seck BC, Jackson RT. Determinants of compliance with iron supplementation among pregnant women in Senegal. *Public Health Nutrition.* 2007;11(6):596-605.
26. Nguyen P, Nava-Ocampo A, Levy A, O'Connor DL, Einarson TR, Taddio A, et al. Effect of iron content on the tolerability of prenatal multivitamins in pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth.* 2008;8:17.
27. Zhou SJ, Gibson RA, Crowther CA, Makrides M. Should we lower the dose of iron when treating anaemia in pregnancy? A randomized dose-response trial. *Eur J Clin Nutr.* 2009;63:183–90.
28. Souza AI, Batista Filho M, Bresani CC, Figueiroa JN, Ferreira LOC. Adherence and side effects in clinical trial comparing three treatment regimens with ferrous sulfate on anemic pregnant women. *Cad Saúde Pública.* 2009;25(6):1225-33.
29. Reveiz L, Gyte GML, Cuervo LG, Casasbuenas A. Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy. *The Cochrane Library.* 2011;(11):CD003094. doi:10.1002/14651858.CD003094.pub2.
30. Mei Z, Cogswell ME, Parvanta I, Lynch S, Beard JL, Stoltzfus RJ, et al. Haemoglobin and ferritin are currently the most efficient indicators of population response to iron intervention: an analysis of nine randomized controlled trails. *J Nutr.* 2005;135:1974-80.
31. Puolakka J, Jänne O, Pakarinen A, Vihko R. Serum ferritin in the diagnosis of anemia during pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1980;95 Suppl:S57-63.

32. Thompson WG. Comparison of tests for diagnosis of iron depletion in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159(5):1132-4.
33. Volpi E, De Grandis T, Alba E, Magione M, Dall'Amico D, Bollati C. Variations in ferritin levels in blood during physiological pregnancy. *Minerva Ginecol.* 1991;43:387-91.
34. van den Broek NR, Letsky EA, White SA, Shenkin A. Iron status in pregnant women: which measurements are valid? *Br J Haematol.* 1998;103:817-24.
35. Tam KF, Lao TT. Hemoglobin and red cell indices correlated with serum ferritin concentration in late pregnancy. *Obstet Gynecol.* 1999;93(3):427-31.
36. Alper BS, Kimber R, Kudumala R. Using ferritin levels to determine iron-deficiency anemia in pregnancy. *J Fam Pract.* 2000;49:829-32.
37. Casanova BF, Sammel MD, Macones GA. Development of a clinical prediction rule for iron deficiency anemia in pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 2005;193:460-6.
38. Beaton GH, McCabe GP; Canadian International Development Agency (CIDA). Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anemia in developing countries - an analysis of experience. Final report to the Micronutrient Initiative. Toronto (CA): CIDA; 1999.
39. Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. *MMWR Recomm Rep.* 1998;47(3):1-36.
40. Centers for Disease Control and Prevention. Iron Deficiency - United States, 1999–2000. *MMWR Recomm Rep.* 2002;51(40):897-9.
41. Puolakka J. Serum ferritin as a measure of iron stores during pregnancy. *Acta obstet Gynecol Scand.* 1980;95 Suppl:S1-31.
42. Petraglia B, da Silva LGP, de Rezende Filho J, Netto HC, Montenegro CAB. Avaliação dos valores eritrocitários no ciclo grávido-puerperal. *J Bras Ginecol.* 1994;1014:139-44.
43. Knight EM, Spurlock BG, Edwards CH, Johnson AA, Oyemade UJ, Cole OJ, et al. Biochemical profile of African American women during three trimesters of pregnancy and at delivery. *J Nutr.* 1994;124(6 Suppl):943-53.
44. van Buul EJ, Steegers EA, Jongsma HW, Eskes TK, Thomas CM, Hein PR. Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study. *Neth J Med.* 1995;46:73-85.
45. Milman N, Byg KE, Agger AO. Haemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2000;79:89-98.

46. Mukhopadhyay A, Bhatla N, Kriplani A, Agarwal N, Saxena R. Erythrocyte indices in pregnancy: effect of intermittent iron supplementation. *Natl Med J India*. 2004;17:135-7.
47. Lurie S, Mamet Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur J Obstet Gynaecol Reprod Biol*. 2000;93:185-92.
48. Choi JW, Pai SH. Change in erythropoiesis with gestational age during pregnancy. *Ann Hematol*. 2001;80:26-31.
49. Milman N. Iron and pregnancy – a delicate balance. *Ann Hematol*. 2006;85:559-65.
50. Perez JR, Valtueña JP, Fernandez VH, Alonso RV. Concentración sérica de ferritina em uma población normal: efecto de la edad, sexo y embarazo. *Rev Clin Esp*. 1980;156(1):39-43.
51. Kaufer M, Casanueva E. Relation of pregnancy serum ferritin levels to hemoglobina levels throughout pregnancy. *Eur J Nutr*. 1990;44(10):709-15.
52. Carreti NG, Eremita AG, Paternoster D, Pellizzari P, Grella P. Iron balance in pregnancy in relation to anemia. *Clin Exp Obstet Gynecol*. 1992;19(4):218-21.
53. Sackett DL, Haynes RB. The architecture of diagnostic research. In: Knottnerus JA, editor. *The evidence base of clinical diagnosis*. London: BMJ books; 2002. p. 19-37.
54. Bresani CC, Braga MC, Felisberto DF, Tavares-de-Melo CEL, Salvi DB, Batista-Filho M. Accuracy of erythrogram and serum ferritin for the maternal anemia diagnosis (AMA): a phase 3 diagnostic study on prediction of the therapeutic responsiveness to oral iron in pregnancy. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 2013;13:13.
<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2393-13-13.pdf>
55. Adamson JW. Anemia and polycythemia. In: Longo DL, Fauci A, Kasper D, Hausen S, Jameson JL, Loscalzo J, editors. *Harrison's principles of internal medicine*. New York: McGraw-Hill; 2005. p. 586-92.
56. Lipschitz DA, Cook JD, Finch CA. A clinical evaluation of serum ferritin as an index of iron stores. *N Engl J Med*. 1974;290(22):1213-6.
57. Jacobs A, Worwood M. Ferritin in serum: clinical and biochemical implications. *N Engl J Med*. 1975;292(18):951-6.
58. Thorpe SJ, Walker D, Arosio P, Heath A, Cook JD, Worwood M. International collaborative study to evaluate a recombinant L ferritin preparation as an International Standard. *Clinical Chemistry*. 1997;43(9):1582-7.
59. Atalah SE, Catillo LC, Castro SR, Aldea PA. Propuesta de um nuevo estándar de evaluación nutricional em embarazadas. *Rev Med Chil*. 1997;125(12):1429-36.

60. Souza AI de, Batista Filho M, Ferreira LOC, Figueirôa JN. The effectiveness of three regimens using ferrous sulfate to treat anemia in pregnant women. *Rev Panam Salud Publica*. 2004;15:313-9.
61. Knottnerus JA, Muris JW. Assessment of the accuracy of diagnostic tests: the cross-sectional study. In: Knottnerus JA, Muris JW, editors. *The evidence base of clinical diagnosis*. London: BMJ books; 2002. p. 39-59.
62. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33:159-74.
63. Greiner M, Pfeiffer D, Smith RD. Principles and practical application of the receiver-operating characteristic analysis for diagnostic tests. *Prev Vet Med*. 2000;45(1-2):23-41.
64. Dugdale AE. Predicting iron and folate deficiency anaemias from standard blood testing: the mechanism and implications for clinical medicine and public health in developing countries. *BMC Theoretical Biology and Medical Modelling*. 2006;3:34.
65. Weng TS. Evaluation of diagnostic tests: measuring degree of agreement and beyond. *Drug Information Journal*. 2001;35:577-88.
66. Sloan NL, Jordan E, Winikoff B. Effects of iron supplementation on maternal hematologic status in pregnancy. *Am J Public Health*. 2002;92:288-93.
67. Casgrain A, Collings R, Harvey LJ, Hooper L, Fairweather-Tait. Effect of iron intake on iron status: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 2012;96:768-80.
68. Berger J, Aguayo VM, San Miguel JL, Lujan C, Tellez W, Traissac P. Definition and prevalence of anemia in bolivian women of childbearing age living at high altitudes: the effect of iron-folate supplementation. *Nutrition Reviews*. 1997;55(6):247-56.
69. Margolis HS, Hardison HH, Bender TR, Dallman PR. Iron deficiency in children: the relationship between pretreatment laboratory tests and subsequent hemoglobina response to iron therapy. *Am J Clin Nutr*. 1981;34:2158-68.
70. Wright CM, Kelly J, Trail A, Parkinson KN, Summerfield G. The diagnosis of boderline iron deficiency: results of a therapeutic trial. *Arch Dis Child*. 2004;89:1028-31.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados dos três estudos desta tese, apresentados em quatro artigos, fizeram parte de seu *rationale* desenvolvido sequencialmente a partir de 2009. A princípio, os resultados do primeiro estudo demonstraram as diferenças que podem ocorrer nas distribuições dos valores do eritrograma em populações diversas, levantando uma série de incertezas quanto à utilidade dos critérios diagnósticos internacionais, utilizados de forma atemporal e difundida, para o manejo da anemia materna. O segundo estudo apresentou evidências de que o critério da Hb tem utilidade duvidosa, tanto para a identificação de gestantes com necessidade de ferroterapia, como para a avaliação da melhora hematológica com o tratamento. Fundamentando-se nesses resultados preliminares, buscaram-se respostas nas bases teóricas que estabelecem os critérios de normalidade para Hb, outros índices eritrocitários e ferritina sérica, colocando-se em xeque sua definição estatística. Nessa perspectiva, o terceiro estudo resgatou o caráter funcional da definição de deficiência de ferro materna e, apoiando-se no conceito terapêutico da normalidade, confirmou a limitada utilidade dos testes diagnósticos rotineiros para o manejo do problema, no contexto pragmático do cuidado pré-natal.

Não seria esperado que as curvas de referência internacionais derivadas de gestantes repletas de ferro de países desenvolvidos fossem replicadas em populações de gestantes sem suplementação com ferro de países em desenvolvimento. Contudo, como a população brasileira está sob fortificação alimentar de ferro e folato desde o ano de 2004 e apenas 10% das participantes do primeiro estudo apresentavam níveis de ferritina abaixo de 12 ng/mL, as suas curvas deveriam se assemelhar às curvas internacionais para que se justificasse o seu uso como padrão de referência universal. As diferenças encontradas entre as curvas estimadas e as de referência indicam que as distribuições dos valores dos índices eritrocitários variam de acordo com as características étnicas e com o perfil epidemiológico das populações e que faixas de normalidade uniformes não devem ser extrapoladas para todas as localidades. O aparente dissenso de que as médias dos índices eritrocitários coincidiram com os seus pontos de corte recomendados, significa, de acordo com a definição estatística da normalidade, que aproximadamente 50% da população estudada apresentaram características eritrocitárias similares aos 2,5% das gestantes consideradas doentes a partir das curvas de referência.

Esses percentuais não carregam significados fisiopatológicos que possam embasar os conceitos de que a presença de anemia (Hb < 10,5 ou 11 g/dL) seria um *proxy* de anemia ferropriva e um estimador indireto da presença de deficiência de ferro numa população, à razão de um caso de anemia para dois a três casos de deficiência de ferro.¹ Corroborando com

essa assertiva está a constatação de que, na população dos dois primeiros estudos desta tese, uma análise publicada previamente observou que a prevalência de anemia ($Hb < 11$ g/dL) não se aproximou da prevalência de anemia ferropriva ($Hb < 11$ g/dL e ferritina sérica < 12 ng/mL): 56,6% *versus* 10,7%;²⁵ e que, apesar da alta frequência de anemia, apenas 17,6% da amostra apresentou hipoferritinemia.²⁵ Do mesmo modo, na segunda população de estudo desta tese, apenas 28% das gestantes anêmicas apresentavam hipoferritinemia.

Seguindo-se o *rationale*, os resultados do segundo estudo reafirmaram que a Hb e os outros índices eritrocitários apresentam baixa acurácia para detectar gestantes com baixos estoques de ferro, diante da fraca associação encontrada entre a presença de anemia e os níveis de ferritina sérica das gestantes. Extrapolando-se a investigação para o contexto pragmático do cuidado pré-natal, os resultados revelaram a alta frequência de vieses ao utilizar os valores de Hb na seleção de pacientes para receber tratamentos e na avaliação de eficácia terapêutica. Na população triada para o ensaio clínico prévio, uma grande parte de mulheres com hipoferritinemia não foi selecionada com base no critério da $Hb < 11$ g/dL para os grupos de intervenção, e a maioria das gestantes tratadas com ferro oral não apresentava hipoferritinemia. Com relação à avaliação de eficácia terapêutica, as variações da Hb em valores absolutos após o ferrotterapia não refletiram as variações nos seus escores Z, implicando na necessidade de se ajustarem os valores de Hb, e possivelmente de outros testes hematológicos, de acordo com a idade gestacional, para que se tenha uma dimensão mais realística da eficácia do ferro oral.

Sendo assim, pode-se afirmar que o uso da Hb como medida única, que se constitui no critério mais largamente recomendado para diagnosticar e indicar tratamento com ferro na gestação, não foi capaz de detectar uma parcela expressiva de casos com baixos estoques de ferro. Adicionalmente, a indicação de tratamento, com base no critério da Hb, não coincidiu com a presença de avidez pelo ferro, como demonstrado nos resultados finais do terceiro estudo, cuja população selecionada de acordo com $Hb < 11$ g/dL não respondeu à ferrotterapia em sua maior parte. Caso a decisão de tratar fosse baseada nos pontos de corte alternativos para HTC ou Hb no 2º trimestre de gestação, metade das gestantes anêmicas ferro-responsivas não seria tratada e metade das não-responsivas seria tratada. Ainda que se lançasse mão do critério da ferritina (< 12 ng/mL), uma grande proporção das gestantes não seria manejada de acordo com sua avidez pelo ferro. É importante enfatizar que as mulheres não-responsivas tenderam a ser tratadas por mais tempo, como pôde ser evidenciado no modelo de regressão linear sob a forma de uma correlação negativa, na qual cada dia de tratamento correspondeu a queda na resposta em escores Z de Hb, denotando que períodos mais longos de tratamento

com ferro oral não resultaram em resposta terapêutica. Conclui-se com isso que as mulheres que não respondem em curto prazo, dificilmente terão resposta significativa à ferroterapia e estarão sujeitas a tratamentos fúteis.

Em última instância, diante da dificuldade de se estabelecer o diagnóstico de certeza da anemia ferropriva na gestação, a utilização de um padrão-ouro pragmático e funcional, através da observação da resposta hematológica à ferroterapia oral, confirmou a baixa acurácia diagnóstica dos índices eritrocitários e revelou acurácia igualmente baixa para a ferritina sérica na detecção de gestantes com deficiência de ferro mobilizável. Os resultados demonstraram o baixo poder dos índices eritrocitários e da ferritina sérica para predizer e para discriminar os casos que se beneficiariam da ferroterapia com a melhora de sua anemia. Por outro lado, demonstrou-se que o método do *teste terapêutico com ferro oral*, desenvolvido nesta tese como uma abordagem para identificar a avidez pelo ferro no período gestacional, se adequou às dinâmicas modificações de volemia, utilização do ferro corporal e eritropoiese, podendo constituir-se em alternativa a ser empregada nos protocolos de tratamento da anemia ferropriva materna.

Por conseguinte, pode-se inferir que grande parte do insucesso observado nas intervenções clínicas com ferro oral e, possivelmente, nas intervenções coletivas, pode ser atribuída a erros de classificação diagnóstica. Essa constatação aponta a urgência por métodos diagnósticos adequados a fim de que o controle da anemia materna como problema de saúde pública seja alcançado.

Para que as conclusões e as recomendações apresentadas a seguir sejam corretamente apreendidas, é importante destacar as limitações e fragilidades dos estudos realizados. Com relação aos dois primeiros estudos, houve um longo hiato de tempo até as reanálises do banco de dados do ensaio clínico prévio. No entanto, os dois primeiros artigos não tiveram a intenção de determinar padrões aplicáveis para a prática atual, mas de exibir inadequações dos critérios correntes que são utilizados de forma ubíqua e atemporal, assim como, de revelar as distorções que a hemodiluição gravídica provoca na avaliação do efeito hematológico de tratamentos com ferro.

Por outro lado, conforme apresentado no terceiro estudo, o desenvolvimento de um padrão de referência confiável para o diagnóstico final de deficiência de ferro constitui-se em grande desafio, sendo que a opção do uso da *resposta a teste terapêutico com ferro oral* esbarrou em dois relevantes problemas. Primeiramente, tiveram que ser enfrentadas questões inerentes ao atendimento pré-natal da população de baixa renda na nossa localidade, como, por exemplo, as barreiras para retornar regularmente para consultas e exames laboratoriais e

as dificuldades na adesão ao tratamento, especialmente quando na presença de efeitos adversos. Essas dificuldades puderam ser superadas a partir do estudo piloto, como relatado no protocolo publicado, o que garantiu a ingestão de uma dose mínima e eficaz de ferro. Esse produto da tese serviu como segurança do cumprimento do protocolo do ensaio clínico, além de possibilitar a sua reprodução futura em estudos locais ou em estudos multicentricos, o que é de especial utilidade, visto que o *rationale* funcional e pragmático empregado não é encontrado em outras publicações.

Outro importante problema metodológico diz respeito às distorções fisiológicas gravídicas impostas à aferição do padrão-ouro. Para tal, empregou-se o método do escore Z da Hb, que não tem sido utilizado desde sua publicação há mais de uma década, com o propósito de relativizar os valores de Hb durante o período gestacional e suplantando as variações fisiológicas dos valores absolutos de Hb. O ajuste da resposta terapêutica de acordo com a semana de gestação visou transpor, não apenas o problema da hemodiluição, mas também outras possíveis variáveis de confusão não mensuráveis, tanto do ponto de vista da evolução da gestação em cada participante, como em relação à heterogeneidade entre as participantes do estudo, que se encontravam em diferentes fases da gestação. Essa abordagem analítica tornou a tese factível, no que diz respeito ao tamanho de amostra, ao tempo e aos recursos materiais disponíveis. Ainda assim, os resultados poderiam ter sido invalidados, caso o *rationale* teórico aplicado no desenvolvimento do padrão-ouro alternativo não se provasse confiável empiricamente no modelo de regressão linear. Outra questão passível de críticas é a curva de referência externa utilizada nos cálculos dos escores Z de Hb, visto que não são curvas representativas da população-alvo. Contudo, essa limitação, somada à ausência de um padrão-ouro laboratorial para a anemia ferropriva materna, ressalta a lacuna existente no conhecimento e a relevância de se estudar o tema.

Por fim, os resultados dos três estudos desenvolvidos como objetos desta tese convergem para a afirmativa de que os índices eritrocitários e a ferritina sérica - em seus critérios atualmente recomendados, com base em pontos de corte estáticos e derivados do conceito estatístico da normalidade - são pouco úteis para identificar gestantes com baixos estoques de ferro e para prever e discriminar a presença de avidez pelo ferro como causa única da anemia nessa população. As modificações gravídicas na eritropoiese e nos líquidos corporais resultam em oscilações fisiológicas nos valores dos testes hematológicos que podem invalidar a aplicação uniforme do paradigma Gaussiano da normalidade nesse contexto, o que se constitui em prerrogativa para que a definição de casos de anemia materna seja realizada sob um prisma funcional e não mais como mera definição estatística.

6 CONCLUSÕES

Os resultados permitem afirmar que os critérios atuais, estabelecidos com base em paradigmas estatísticos da normalidade, estão propensos a erros nos manejos individual e coletivo da anemia ferropriva materna, como pode ser inferido a partir das conclusões abaixo, referentes a mulheres no curso dos 2º e 3º trimestres de gestação de baixo risco na nossa localidade.

- a) As curvas de distribuição de valores dos índices eritrócitários não coincidem com as curvas de referência internacionais, das quais são derivados os seus pontos de corte atualmente utilizados.
- b) Os critérios diagnósticos atualmente utilizados superestimam a deficiência de ferro como causa isolada de anemia gestacional, podendo resultar em negligenciamento da investigação das outras causas de anemia, não responsivas ao ferro.
- c) Os índices eritrocitários apresentam pobre acurácia para o diagnóstico de anemia materna associada a baixos estoques de ferro, de acordo com os níveis séricos de ferritina.
- d) Quando se utiliza a variação de Hb em valores absolutos para avaliar a eficácia de diferentes esquemas com ferroterapia oral, distorções provocadas pela hemodiluição gravídica interferem não só na comparabilidade entre-estudos, mas também na comparabilidade intra-estudo.
- e) Tanto os índices eritrocitários, como a ferritina sérica, mostraram um baixo rendimento diagnóstico para a tomada de decisão na indicação de ferroterapia eficaz, no cenário prático do cuidado pré-natal.
- f) Não só os índices eritrocitários, mas também a ferritina sérica, apresentam baixo poder informativo para identificar e discriminar gestantes com anemia associada à deficiência funcional de ferro, de acordo com a responsividade ou não ao ferro oral.
- g) A presença de índices eritrocitários normais na anemia materna leve a moderada ($7 \text{ g/dL} \leq \text{Hb} < 11 \text{ g/dL}$) fala contra a necessidade de ferro.

- h) A baixa acurácia diagnóstica da ferritina sérica no diagnóstico de anemia ferropriva, de acordo com o teste terapêutico com ferro oral, confirma o seu papel fisiológico como proteína de estoque tissular de ferro, sugerindo não ser capaz de refletir o ferro corporal mobilizável.
- i) Erros de classificação diagnóstica na identificação das mulheres que têm deficiência funcional de ferro como única causa de sua anemia constituem-se em uma possível causa de ineficácia da ferroterapia.
- j) O aumento de Hb em valores absolutos não traduz melhoria efetiva na massa eritrocitária durante a gestação, apesar de ser considerado o indicador mais confiável da carência de ferro na população geral.
- k) A resposta ao teste terapêutico com ferro oral em curto prazo, aferida através das variações nos escores Z da Hb, se correlaciona independentemente com a dose total de ferro ingerida;
- l) A resposta ao teste terapêutico com ferro oral em curto prazo, aferida através das variações nos escores Z da Hb, presta-se como alternativa diagnóstica de baixo custo na prática clínica do cuidado pré-natal para a otimização do manejo clínico do problema.

7 RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados deste trabalho, sugere-se que a definição de anemia e de deficiência de ferro em gestantes seja redimensionada e que a presença de anemia nas populações deixe de ser encarada como *um conceito mais estatístico que fisiológico* (OMS 2001). Neste sentido, recomenda-se que:

- a) A presença de Hb baixa na gestação não deve ser utilizada como *proxy* ou como estimador indireto de deficiência de ferro materna na nossa população.
- b) Em gestantes após o 1º trimestre de gestação com anemia leve a moderada ($7 \text{ g/dL} \leq \text{Hb} < 11 \text{ g/dL}$) e com todos os demais índices eritrocitários dentro da faixa da normalidade, outras causas de anemia, além da deficiência de ferro, devem ser investigadas em detrimento da ferroterapia rotineira.
- c) Em mulheres após o 1º trimestre de gestação com anemia leve a moderada ($7 \text{ g/dL} \leq \text{Hb} < 11 \text{ g/dL}$), a contagem de eritrócitos abaixo do ponto de corte corrente pode ser aplicada como *screening* para indicar o início da ferroterapia.
- d) A ferroterapia para mulheres após o 1º trimestre de gestação com anemia leve a moderada ($7 \text{ g/dL} \leq \text{Hb} < 11 \text{ g/dL}$) não deve ser empregada rotineiramente como ação de controle da anemia materna, e sim, iniciada como teste terapêutico para confirmar em curto prazo os casos de anemia responsiva ao ferro, que se beneficiarão da ferroterapia sem necessidade de investigações etiológicas adicionais.
- e) O teste terapêutico com ferro oral pode indicar em curto prazo a responsividade ao ferro, configurando-se em ferramenta de baixo custo para tomada de decisão em manter ou não a ferroterapia, especialmente na presença de efeitos adversos gastrointestinais.
- f) A resposta terapêutica em curto prazo deve ser aferida em escores Z de Hb, sugerindo-se como critério um aumento igual ou superior a 0,2 escore Z de Hb após 4 semanas de tratamento com 60 mg diários de ferro elementar.
- g) De imediato, um nomograma, plotando os escores Z de Hb em cada semana de gestação pode ser construído a partir da curva de referência internacional para orientar o acompanhamento da ferroterapia individual e coletiva (vide Apêndice D).

- h) Os órgãos governamentais responsáveis pelo controle da anemia materna devem implementar inquéritos com amostras representativas de gestantes das várias regiões do país, a fim de estimar curvas de referência locais e permitir, em médio prazo, a construção de nomogramas mais apropriados que terão o papel de orientar a indicação e o acompanhamento da ferroterapia individual e coletiva.
- i) Os órgãos oficiais de desenvolvimento de pesquisa e inovação devem incentivar pesquisas básicas e translacionais para o desenvolvimento de novos testes hematológicos que tenham um melhor rendimento diagnóstico na gestação, assim como, estudos de validação avançados sobre os testes hematológicos já de uso rotineiro.
- j) Os estudos sobre testes hematológicos no diagnóstico de anemia ferropriva materna devem aplicar metodologias mais coerentes com as dinâmicas alterações fisiológicas, a exemplo do desenho pragmático e do conceito de normalidade funcional empregados nesta tese.
- k) Os ensaios clínicos com ferroterapia durante a gravidez devem controlar as alterações fisiológicas maternas utilizando grupos de comparação pareados de acordo com a idade gestacional ou ajustando os valores dos testes de acordo padrões de referência para as semanas de gestação de cada participante.

REFERÊNCIAS

1. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control – a guide for programme managers. Geneva, 2001.
2. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Control of nutritional anaemia with special reference to iron deficiency. Geneva, 1975. (WHO Technical Report Series n. 580).
3. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Worldwide prevalence of anaemia 1993–2005: WHO global database on anaemia. Geneva, 2008.
4. STOLTZFUS, R. J. Iron deficiency: global prevalence and consequences. Food Nutr. Bull., Tokyo, v. 24, supl. 4, p. 99-103, 2003.
5. GARN, S. M. et al. Maternal hematologic levels and pregnancy outcomes. Semin. Perinatol., New York, v. 5, n. 2, p. 155-162, 1981.
6. MURPHY, J. F. et al. Relation of haemoglobin levels in first and second trimesters to outcome of pregnancy. Lancet, London, p. 992-995, 1986.
7. SCHOLL, T. O. et al. Anemia vs iron deficiency: increase risk of preterm delivery in a prospective study. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 55, p. 985-988, 1992.
8. STEER, P. et al. Relation between maternal haemoglobin concentration and birth weight in different ethnic groups. Br. Med. J., London, v. 310, p. 489-491, 1995.
9. ALLEN, L. H. Anemia and iron deficiency: effects on pregnancy outcome. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v.71, supl., p. 1280-1284, 2000.
10. SCHOLL, T. O.; REILLY, T. Anemia, iron and pregnancy outcome. J. Nutr., Philadelphia, v. 130, n. 2, p. 443, 2000.
11. YIP R. Significance of an abnormally low or high hemoglobin concentration during pregnancy: special consideration of iron nutrition. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 72, supl., p. 272-279, 2000.
12. RASMUSSEN, K. M. Iron deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. Is there a causal relationship between iron deficiency or iron-deficiency anemia and weight at birth, length of gestation and perinatal mortality? J. Nutr., Philadelphia, v. 131, supl., p. 590-603, 2001.
13. RONNENBERG, A. G. et al. Preconception hemoglobin and ferritin concentrations are associated with pregnancy outcome in a prospective cohort of chinese women. J. Nutr., Philadelphia, v. 134, p. 2586-2591, 2004.
14. SHOBEIRI, F.; BEGUM, K.; NAZARI, M. A prospective study of maternal hemoglobin status of Indian women during pregnancy and pregnancy outcome. Nutr. Res., New York, n. 26, p. 209-213, 2006.

15. RUSH D. Nutrition and maternal mortality in the developing world. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 72, supl., p. 212-240, 2000.
16. BRABIN, B. J.; HAKIMI, M.; PELLETIER, D. Iron-deficiency anemia: reexamining the nature and magnitude of the public health problem. An analysis of anemia and pregnancy-related maternal mortality. J. Nutr., Philadelphia, v. 131, supl., p. 604-615, 2001.
17. LITTLE, M. P. et al. Hemoglobin concentration in pregnancy and perinatal mortality: a London-based cohort study. Am. J. Obstet. Gynecol., St Louis, v. 193, p. 220-226, 2005.
18. UNICEF; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Prevention and control of iron deficiency anaemia in women and children. Geneve, 1999.
19. SANTOS, L. M. P. (Org.). Bibliografia sobre deficiência de micronutrientes no Brasil: 1990-2000. Brasília, DF: OPAS, 2002: v. 2.
20. BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. Cad. Saúde Pública., Rio de Janeiro, v. 19, supl. 1, p. 181-191, 2003.
21. BATISTA FILHO, M.; SOUZA, A. I.; MIGLIOLI, T. C.; SANTOS, M. C. Anemia: um paradoxo da transição nutricional brasileira. Cad. Saúde Pública., v. 24, supl. 2, p. 247-257, 2008.
22. BATISTA FILHO, M.; ROMANI, S. A. M. Alimentação, nutrição e saúde no estado de Pernambuco. Recife: IMIP, 2002. (Série de Publicações Científicas do Instituto Materno Infantil de Pernambuco, n.7).
23. ARRUDA, I. K. G. Deficiência de ferro, de folato e anemia em gestantes atendidas no Instituto Materno Infantil de Pernambuco: magnitude, fatores de risco e algumas implicações nos seus conceitos. 1997. Tese (Doutorado) – Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1997.
24. PEREIRA, R. C. Anemia em parturientes da maternidade Prof. Monteiro de Morais e peso-ao-nascer: impacto de condicionantes macro e micro-estruturais. 1997. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 1997.
25. BRESANI, C. C. et al. Anemia e ferropenia em gestantes: dissensos de resultados de um estudo transversal. Rev. Bras. Saúde Matern. Infant., Recife, v. 7, supl. 1, p. 15-22, 2007.
26. SZARFARC, S. C. Public policies to control iron deficiency in Brazil. Rev. Bras. Hematol. Hemoter., São Paulo, v. 32, supl. 2, p. 2-7, 2010.
27. BEATON, G. H.; MCCABE, G. P. Efficacy of intermittent iron supplementation in the control of iron deficiency anemia in developing countries: an analysis of experience - final report to the Micronutrient Initiative. Toronto: Canadian International Development Agency, 1999.

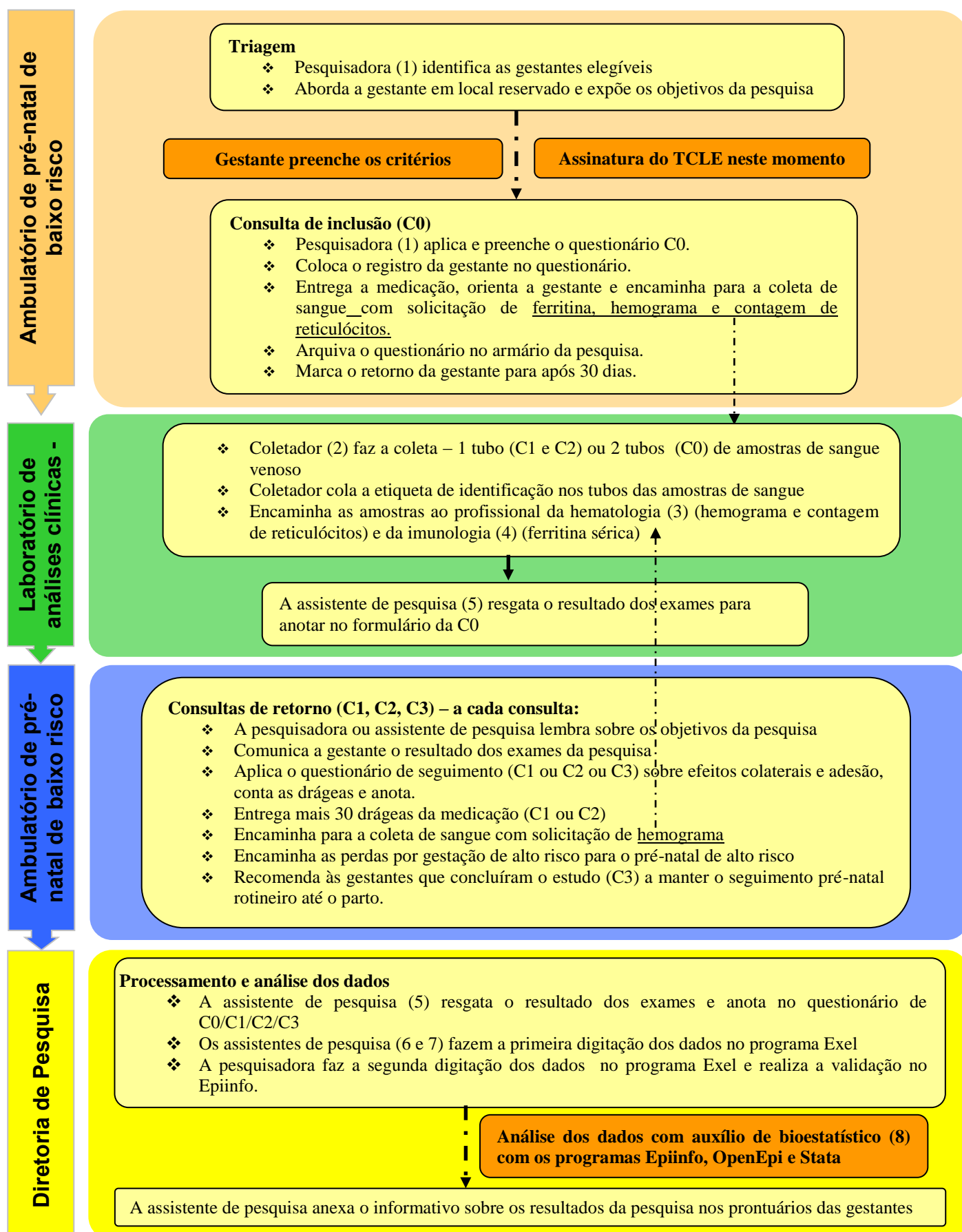
28. AGARWAL, K. N.; AGARWAL, D. K.; MISHRA, K. P. Impacto of anemia prophylaxis in pregnancy on maternal haemoglobin, serum ferritin & birth weight. Indian J. Med. Res., New Delhi, p. 277-280, 1991.
29. HEMMINKI, E.; RIMPELÄ, U. Iron supplementation, maternal packed cell volume, and fetal growth. Arch. Dis. Child., London, v. 66, p. 422-425, 1991.
30. CHRISTIAN, P. et al. The effect of maternal micronutrient supplementation on early neonatal morbidity in rural Nepal: a randomised, controlled, community trial. Arch. Dis. Child., London; v. 93, p. 660-664, 2008.
31. CHRISTIAN, P. et al. Effects of prenatal micronutrient supplementation on complications of labor and delivery and puerperal morbidity in rural Nepal. Int. J. Gynecol. Obstet., Limerick, v. 106, p. 3-7, 2009.
32. SHAH, P. S.; OHLSSON, A. Effects of prenatal multimicronutrient supplementation on pregnancy outcomes: a meta-analysis. CMAJ, Ottawa, v. 180, n. 12, p. 99-108, 2009.
33. EKSTRÖM, E. C. M. et al. Adherence to iron supplementation during pregnancy in Tanzania: determinants and hematologic consequences. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 64, p. 368-374, 1996.
34. EKSTRÖM, E. C. et al. Efficacy and trial effectiveness of weekly and daily iron supplementation among pregnant women in rural Bangladesh: disentangling the issues. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 76, p. 1392-1400, 2002.
35. HYDER, S. M. et al. Do side-effects reduce compliance to iron supplementation? A study of daily- and weekly-dose regimens in pregnancy. J. Health Popul. Nutr., Dhaka, v. 20, p. 175-179, 2002.
36. MAKRIDES, M. et al. Efficacy and tolerability of low-dose iron supplements during pregnancy: a randomized controlled trial. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 78, p. 145-153, 2003.
37. KUMAR, A. et al. Oral versus high dose parenteral iron supplementation in pregnancy. Int. J. Gynecol. Obstet., Limerick, v. 89, p. 7-13, 2005.
38. SAHA, L. et al: Comparison of efficacy, tolerability, and cost of iron polymaltose complex with ferrous sulphate in the treatment of iron deficiency anaemia in pregnant women. MedGenMed, New York, v. 9, p. 1, 2007.
39. SECK, B. C.; JACKSON, R. T. Determinants of compliance with iron supplementation among pregnant women in Senegal. Public Health Nutr., Wallingford, v. 11, n. 6, p. 596-605, 2007.
40. NGUYEN, P. et al. Effect of iron content on the tolerability of prenatal multivitamins in pregnancy. BMC Pregnancy Childbirth, London, v. 8, p. 17, 2008.
41. ZHOU, S. J. et al. Should we lower the dose of iron when treating anaemia in pregnancy? A randomized dose-response trial. Eur. J. Clin. Nutr., London, v. 63, p. 183-190, 2009.

42. SOUZA, A. I. et al. Adherence and side effects in clinical trial comparing three treatment regimens with ferrous sulfate on anemic pregnant women. Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, p. 1225-133, 2009.
43. REVEIZ, L. et al. Treatments for iron-deficiency anaemia in pregnancy. Cochrane database syst. rev., Oxford, v. 11.
44. YIP, R.; JOHNSON, C.; DALLMAN, P. R. Age-related changes in laboratory values used in the diagnosis of anemia and iron deficiency. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 39, p. 427-436, 1984.
45. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (ESTADOS UNIDOS). Recommendations to prevent and control iron deficiency in the United States. MMWR Recomm. Rep. 1998, 47 (RR-3): 1-36.
46. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (ESTADOS UNIDOS). Iron Deficiency - United States, 1999–2000. MMWR Recomm. Rep. 2002, 51 (40): 897-899.
47. Adamson JW, Longo DL. Anemia and polycythemia. In: KASPER, D. L. et al (Ed.). Harrison's principles of internal medicine. New York: McGraw-Hill, 2005. p. 329-336.
48. STOLTZFUS, R. J. Rethinking anaemia surveillance. Lancet, London, v. 349, p. 1764-1766, 1997.
49. SACKETT, D. L.; HAYNES, R. B. The architecture of diagnostic research. In: KNOTTNERUS, J. A. (Ed.). The evidence base of clinical diagnosis. London: BMJ Books, 2002. p. 19-37.
50. PUOLAKKA, J. et al. Serum ferritin in the diagnosis of anemia during pregnancy. Acta Obstet. Gynecol. Scand., Stockholm, v. 95, supl., p. 1-81, 1980.
51. VAN DEN BROEK, N. R. et al. Iron status in pregnant women: which measurements are valid? Br. J. Haematol., Oxford, v. 103, p. 817-824, 1998.
52. THOMPSON, W. G. Comparison of tests for diagnosis of iron depletion in pregnancy. Am. J. Obstet. Gynecol., St Louis, v. 159, n. 5, p. 1132-1134, 1988.
53. VOLPI, E. et al. Variations in ferritin levels in blood during physiological pregnancy. Minerva Ginecol., Torino, v. 43, p. 387-391, 1991.
54. TAM, K. F; LAO, T. T. Hemoglobin and red cell indices correlated with serum ferritin concentration in late pregnancy. Obstet. Gynecol., Hagerstown, v. 93, n. 3, p. 427-431, 1999.
55. ALPER, B. S.; KIMBER, R.; KUDUMALA, R. Using ferritin levels to determine iron-deficiency anemia in pregnancy. J. Fam. Pract., New York, v. 49, p. 829-832, 2000.

56. CASANOVA, B. F.; SAMMEL, M. D.; MACONES, G. A. Development of a clinical prediction rule for iron deficiency anemia in pregnancy. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, St Louis, v. 193, p. 460-466, 2005.
57. MEI, Z. et al. Assesment of iron status in US pregnant women from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES), 1999-2006. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 93, p. 1312-1320, 2011.
58. SOUZA, A. I.; BATISTA FILHO, M.; FERREIRA, L. O. C. Alterações hematológicas e gravidez. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 29-36, 2002.
59. CUNNIGHAM, F.G. et al. Maternal adaptations to pregnancy. In: CUNNIGHAM, F. G. et al (Ed.). *Williams Obstetrics*. 19th ed. New York: Appleton & Lange, 1993. p. 187-203.
60. MILMAN, N. Iron and pregnancy – a delicate balance. *Ann. Hematol.*, Berlin, v. 85, p. 559-565, 2006.
61. PETRAGLIA, B. et al. Avaliação dos valores eritrocitários no ciclo grávido-puerperal. *J. Bras. Ginecol.*, Rio de Janeiro, v. 1014, p. 139-144, 1994.
62. KNIGHT, E. M. et al. Biochemical profile of African American women during three trimesters of pregnancy and at delivery. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 124, supl. 6, p. 943-953, 1994.
63. VAN BUUL, E. J. et al. Haematological and biochemical profile of uncomplicated pregnancy in nulliparous women; a longitudinal study. *Neth. J. Med.*, Amsterdam, v. 46, p. 73-85, 1995.
64. MILMAN, N.; BYG, K. E.; AGGER, A. O. Haemoglobin and erythrocyte indices during normal pregnancy and postpartum in 206 women with and without iron supplementation. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.*, Stockholm, v. 79, p. 89-98, 2000.
65. MUKHOPADHYAY, A. et al. Erythrocyte indices in pregnancy: effect of intermittent iron supplementation. *Natl. Med. J. India*, New Delhi, v. 17, p. 135-137, 2004.
66. LURIE, S.; MAMET, Y. Red blood cell survival and kinetics during pregnancy. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, Amsterdam, v. 93, p. 185-192, 2000.
67. CHOI, J. W.; PAI, S. H. Change in erythropoiesis with gestational age during pregnancy. *Ann. Hematol.*, Berlin, v. 80, p. 26-31, 2001.
68. SLOAN, N. L.; JORDAN, E.; WINIKOFF, B. Effects of iron supplementation on maternal hematologic status in pregnancy. *Am. J. Public Health*, Washington, v. 92, p. 288-293, 2002.
69. MUMTAZ, Z. et al. Daily iron supplementation is more effective than twice weekly iron supplementation in pregnant women in Pakistan in a randomized double-blind clinical trial. *J. Nutr.*, Philadelphia, v. 130, p. 2697-2702, 2000.

70. SOUZA, A. I. et al. The effectiveness of three regimens using ferrous sulfate to treat anemia in pregnant women. Rev. Panam. Salud. Pública, Washington, v. 15, p. 313-319, 2004.
71. CASGRAIN, A. et al. Effect of iron intake on iron status: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 96, p. 768-780, 2012.
72. SCHOLL, T. O. et al. Anemia vs iron deficiency: increased risk of preterm delivery in a prospective study. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 55, p. 985-988, 1992.
73. BAREFORD, D. et al. Predictors of ratio of placental weight to fetal weight in multiethnic community. BMJ, London, v. 310, p. 436-439, 1995.
74. FRIIS, H. et al. HIV and other predictors of serum folate, serum ferritin, and hemoglobin in pregnancy: a cross-sectional study in Zimbabwe. Am. J. Clin. Nutr., Bethesda, v. 73, p. 1066-1073, 2001.
75. RONNENBERG, A. G. et al. Preconception hemoglobin and ferritin concentrations are associated with pregnancy outcome in a prospective cohort of chinese women. J. Nutr., Philadelphia, v. 134, p. 2586-2591, 2004.
76. PUOLAKKA, J. et al. Serum ferritin in the diagnosis of anemia during pregnancy. Acta Obstet. Gynecol. Scand., Stockholm, v. 95, suppl., p. 57-63, 1980.
77. MEI, Z. et al. Hemoglobin and ferritin are currently the most efficient indicators of population response to iron interventions: an analysis of nine randomized controlled trials. J. Nutr., Philadelphia, v. 135, p. 1974-1980, 2005.
78. MILMAN, N. Prepartum anaemia: prevention and treatment. Ann. Hematol., Berlin, v. 87, p. 949-959, 2008.
79. KAUFER, M.; CASANUEVA, E. Relation of pregnancy serum ferritin levels to hemoglobina levels throughout pregnancy. Eur. J. Clin. Nutr., London, v. 44, n. 10, p. 709-715, 1990.
80. KNOTTNERUS, J. A.; MURIS, J. W. Assessment of the accuracy of diagnostic tests: the cross-sectional study. In: KNOTTNERUS, J. A. (Ed.). The evidence base of clinical diagnosis. London: BMJ Books, 2002. p. 39-59.

APÊNCICE A - ALGORITMO DOS PROCEDIMENTOS DE ATENDIMENTO ÀS GESTANTES NO ESTUDO AMA



APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisa: Acurácia dos índices eritrocitários e da ferritina sérica no diagnóstico de anemia ferropriva em gestantes

IMIP – Instituto de Medicina Integral Prof Fernando Figueira

Meu nome é Cristiane Campello Bresani, sou médica do IMIP e atualmente estou fazendo uma pesquisa para conhecer qual a melhor maneira de diagnosticar e tratar a anemia na gravidez. Se você concordar em participar desta pesquisa você será acompanhada pela minha equipe de pesquisa e receberá a medicação (comprimidos de sulfato ferroso) toda vez que vier à consulta do seu pré-natal. O sulfato ferroso é um medicamento muito usado na gravidez e não traz problemas para o feto. Você poderá sentir alguns efeitos colaterais, como alteração no apetite, dores na barriga, náuseas, vômitos, diarreia ou intestino preso e fezes escuras.

Será realizada a entrevista inicial onde você responderá a algumas perguntas sobre sua saúde e sua condição social, quando fará a coleta dos primeiros exames para a pesquisa. Após 10, 30, 60 e 90 dias do início da medicação serão necessárias novas coletas de sangue. O acompanhamento será realizado durante 90 dias, com consultas a cada 30 dias, durante o seu pré-natal de rotina, quando você responderá a algumas perguntas sobre as tomadas da medicação e sobre possíveis sintomas de efeitos colaterais. Durante e após esse período o seu acompanhamento pré-natal prosseguirá normalmente. As coletas de sangue para os exames podem gerar os mesmos desconfortos que qualquer outro exame de sangue, então você pode sentir dor no local da retirada do sangue, e o local poderá permanecer dolorido e roxo por alguns dias; às vezes pode ocorrer uma inflamação na região que é tratada com compressas e menos frequentemente com antibióticos.

Além dos exames para a pesquisa, você fará normalmente os exames de rotina que toda gestante faz no pré-natal. Garantimos que os resultados dos exames lhe serão informados e que qualquer custo adicional decorrente da pesquisa, tais como transporte para consultas fora da rotina e medicamentos para tratamentos das possíveis complicações do uso do sulfato ferroso ou da retirada de sangue, serão pagos pela equipe de pesquisa. Além disso, ao final da pesquisa, disponibilizaremos em seu prontuário hospitalar um resumo com a explicação dos principais resultados desse estudo.

Pedimos aqui também a permissão para utilizar nas nossas análises os resultados dos seus exames já realizados no pré-natal atual, antes da sua entrada na pesquisa.

Você pode não concordar em participar ou desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem nenhum prejuízo, pois o seu atendimento de pré-natal continuará sendo feito normalmente no IMIP.

A dose que você tomará para o tratamento de sua anemia será maior que a prescrita no pré-natal rotineiro do IMIP, mas é mais baixa que a recomendada pelo Ministério da Saúde. Portanto, caso a sua anemia se agrave, você será encaminhada para consulta médica para iniciar tratamento com doses maiores de sulfato ferroso.

Eu estarei à disposição para tirar dúvidas e atende-la fora do seguimento normal da pesquisa se necessário. Você poderá entrar em contato comigo através do número (081) 99227164, ou através da assistente de pesquisa Débora pelo número (081) 88541592.

Caso concorde em participar da pesquisa, por favor, assine abaixo:

_____ data: _____

APÊNDICE C - INSTRUMENTOS PARA ENTREVISTA E COLETA DOS DADOS
DO ESTUDO AMA

FORMULÁRIO DA PESQUISA C₀ = consulta de inclusão no estudo

ESTADO NUTRICIONAL DE GESTANTES ATENDIDAS EM SERVIÇOS DE ASSISTÊNCIA PRÉ-NATAL NO ESTADO DE PERNAMBUCO

DATA ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO

NÚMERO DO PRONTUÁRIO

1.	Nº do Questionário								
2.	Município _____								
3.	Centro de pesquisa: _____								
4.	Situação do município:	<input type="checkbox"/> 1	Urbano	<input type="checkbox"/> 2	Rural				
5.	Data de Nascimento: ___/___/___								
6.	Profissão: _____								

Nível de escolaridade da mulher:

- 7.
- | | |
|---|---------------------------|
| (1) Nunca frequentou escola | (5) 1º Grau incompleto |
| (2) 1º grau completo (da 1ª a 8ª série) | (6) 2º grau incompleto |
| (3) 2º grau completo (da 9ª a 11ª) | (7) superior – incompleto |
| (4) SUPERIOR – COMPLETO | (8) pós-graduação |
| | (09) Não sabe |

Características Sociodemográficas:

Renda familiar Mensal (R\$) _____,00

Número de Pessoas em domicílio: ___ __

Classe econômica:

Grau de instrução do chefe de família	PONTOS
Analfabeto / Primário incompleto (até 3ª série fundamental)	0
Primário Completo / Ginásial Incompleto (até 4ª série fundamental)	1
Ginásial Completo / Colegial Incompleto (fundamental completo)	2
Colegial Completo / Superior Incompleto (médio completo)	4
Superior Completo	8

8.

Posse de itens:

ITENS	0	1	2	3	4 ou +
Televisor em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquinas de lavar	0	2	2	2	2
Videocassete e/ou DVD	0	2	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (aparelho independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

CORTES DO CRITÉRIO DE CLASSIFICAÇÃO ECONÔMICA BRASIL

CLASSE	PONTOS
A1	42-46
A2	35-41
B1	29-34
B2	23-28
C1	18-22
C2	14-17
D	8-13
E	0-7

9. **Situação conjugal:**
Casada Solteira Viúva União Consensual Divorciada

10. **Identificação da gestante**
Nome da gestante _____ RG: _____
Data de Nascimento: ____/____/____ Idade: _____
Endereço: _____ Bairro: _____ Cidade: _____
U.F.: _____ CEP: _____
Ponto de referência: _____
Ocupação/Profissão: _____
Telefones: (_____) (_____) (_____)

Raça/Cor:
Branca Negra Mulata Parda Índia Outra

11. **Identificação do companheiro** Não Sim
Tem companheiro?
Nome do companheiro: _____ RG: _____
Telefone para contato: _____

Data da entrevista: ____/____/2011

				2	0	1	1
--	--	--	--	---	---	---	---

Entrevistador

Supervisor de campo

Total de folhas

HISTÓRIA REPRODUTIVA

1. Em que idade menstruou pela primeira vez?			anos
2. Quantas vezes engravidou?			vezes
3. Quantos partos já teve?			vezes
4. Quando foi a última gestação? (Mês ____ Ano ____)			
5. Qual o tipo de parto da última gestação?			
<input type="checkbox"/>	Normal	<input type="checkbox"/>	Cesário
<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>	Fórceps
6. Onde foi realizado seu último parto? Hospital Maternidade Casa Outro			
7. Tomou vitamina A na alta hospitalar do último parto?		Sim	Não
8. Fez consultas após a alta (pós-natais) do último parto?		Sim	Não
9. Fez tratamento para anemia na última gravidez?		Sim	Não

10. Teve hemorragia (grande sangramento, precisando ser vista pelo médico) no último parto?		Sim		Não
11. Tomou sangue/transusão de sangue no último parto?		Sim		Não
12. Você tem feito pré-natal nessa gravidez?		Sim		Não
13. Quantas consultas de pré-natal você já fez?				Consultas
14. Com quantos meses de gravidez fez a 1ª consulta?				Meses
15. Teve alteração na glicose/açúcar no sangue na última gravidez?		Sim		Não
16. Teve hipertensão (pressão alta) na última gravidez?		Sim		Não
17. Na gravidez atual você está em uso de tratamento para anemia? Qual? (nome da medicação _____ posologia _____)		Sim		Não
18. Está usando algum remédio nessa gravidez? Vitaminas? Qual? _____ Outros medicamentos? Quais? _____		Sim		Não
19. Já teve aborto?		Sim		Não
20. Quantos abortos?				
21. Quando foi o último aborto? (Mês __ __ Ano __ __)				
22. Teve hemorragia (grande sangramento, precisando ser vista pelo médico) no último aborto?		Sim		Não
23. Tomou sangue/transusão de sangue no último aborto?		Sim		Não
DADOS CLÍNICOS				
1. DUM: Qual foi o dia em que chegou a sua última menstruação (Dia __ __ Mês __ __ Ano __ __)				
2. USG de 1º trimestre (Dia __ __ Mês __ __ Ano __ __)				
3. Idade gestacional pela DUM		Semanas		Dias
4. Idade gestacional na USG de 1º trimestre		Semanas		Dias
5. Altura de Fundo de Útero (__ __ cm) OBS - se divergência > 1sem entre IG pela DUM e USG				Cm
6. Peso no início da gravidez (__ __ , __ Kg)				Kg
7. Peso atual da gestante (__ __ , __ Kg)				Kg
8. Altura da gestante (__ __ cm)				Cm
9. Presença de edema maleolar		Sim		Não
10. Pressão arterial Sistólica: __ __ mmHg				mmHg
11. Pressão arterial Diastólica: __ __ mmHg				mmHg

FORMULÁRIO DE SEGUIMENTO (C1/C2C3)

Nº PRONTUÁRIO						Nº QUESTIONÁRIO					
NOME:											
ENDEREÇO (caso tenha mudado): logradouro-											
nº				Bairro -				Cidade -			
Telefones (caso tenham mudado)											

DADOS CLÍNICOS

CONSULTA 1 _/_/___		CONSULTA 2 _/_/___		CONSULTA 3 _/_/___	
Pirose (queimação na "boca do estômago")	1.SIM	Pirose (queimação na "boca do estômago")	1.SIM	Pirose (queimação na "boca do estômago")	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Anorexia (falta de apetite ou fastio)	1.SIM	Anorexia (falta de apetite ou fastio)	1.SIM	Anorexia (falta de apetite ou fastio)	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Náuseas (enjôo)	1.SIM	Náuseas (enjôo)	1.SIM	Náuseas (enjôo)	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Vômitos	1.SIM	Vômitos	1.SIM	Vômitos	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Diarréia (fezes mais amolecidas ou mais vezes ao dia que o seu normal)	1.SIM	Diarréia (fezes mais amolecidas ou mais vezes ao dia que o seu normal)	1.SIM	Diarréia (fezes mais amolecidas ou mais vezes ao dia que o seu normal)	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Constipação (prisão de ventre = fezes mais duras ou menos vezes que o seu normal)	1.SIM	Constipação (prisão de ventre = fezes mais duras ou menos vezes que o seu normal)	1.SIM	Constipação (prisão de ventre = fezes mais duras ou menos vezes que o seu normal)	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Cólicas na barriga	1.SIM	Cólicas na barriga	1.SIM	Cólicas na barriga	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Sangramentos	1.SIM	Sangramentos	1.SIM	Sangramentos	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Edema maleolar	1.SIM	Edema maleolar	1.SIM	Edema maleolar	1.SIM
	2. NÃO		2. NÃO		2. NÃO
Peso atual (___ ____, ___ Kg)		Peso atual (___ ____, ___ Kg)		Peso atual (___ ____, ___ Kg)	
Altura atual (___ ____, ___ cm)		Altura atual (___ ____, ___ cm)		Altura atual (___ ____, ___ cm)	
PA sistólica (___ ____, mmHg)		PA sistólica (___ ____, mmHg)		PA sistólica (___ ____, mmHg)	

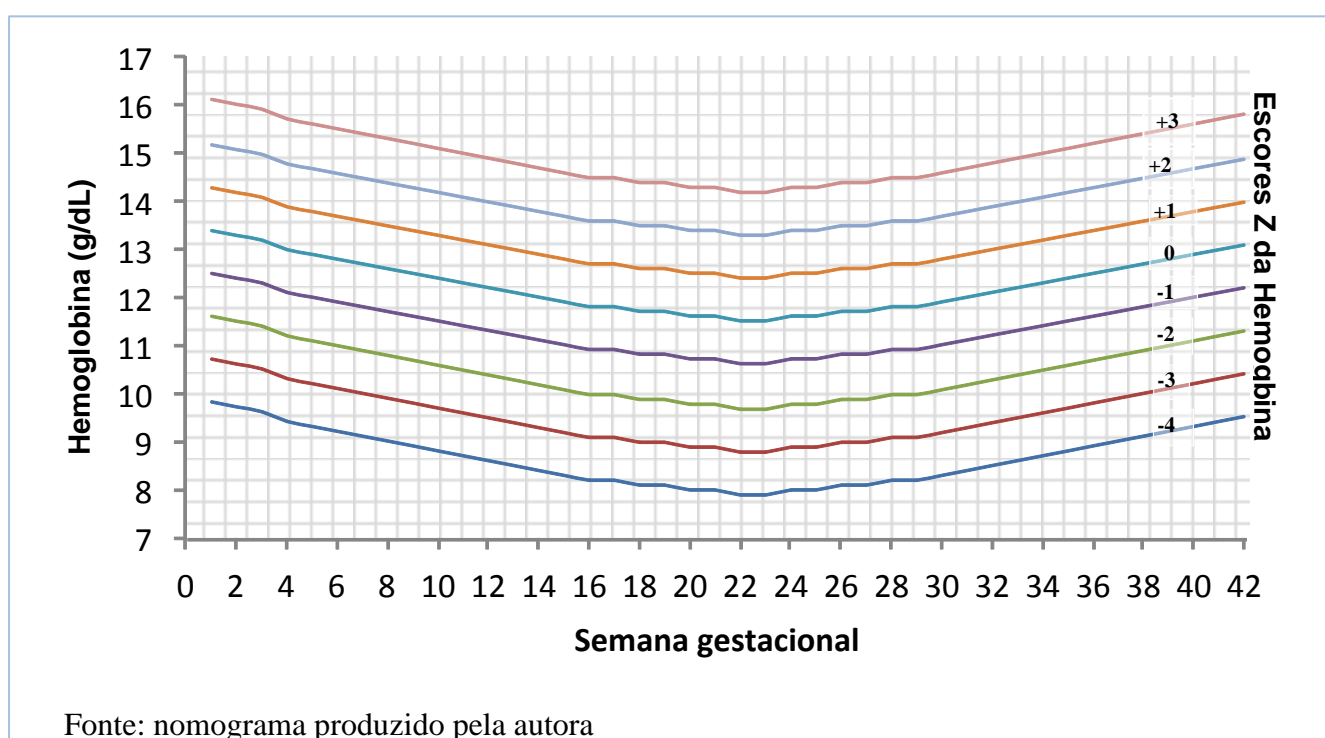
PA diastólica (___ ___ mmHg)				PA diastólica (___ ___ mmHg)				PA diastólica (___ ___ mmHg)			
DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO				DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO				DATA DO INÍCIO DO TRATAMENTO			
Contagem de drágeas tomadas				Contagem de drágeas tomadas				Contagem de drágeas tomadas			
NÃO TROUXE				NÃO TROUXE				NÃO TROUXE			
Quantas drágeas vc deixou ?				Quantas drágeas vc deixou ?				Quantas drágeas vc deixou ?			
NÃO SEI				NÃO SEI				NÃO SEI			

EXAMES COMPLEMENTARES

EXAME 1					EXAME 2					EXAME 3				
___/___/___					___/___/___					___/___/___				
Hemácias	___			10 ¹² (cél/L)	Hemácias	___			10 ¹² (cél/L)	Hemácias	___			10 ¹² (cél/L)
Hb	___			%	Hb	___			%	Hb	___			%
HTC	___, ___			%	HTC	___, ___			%	HTC	___			%
VCM	___, ___			fL	VCM	___			fL	VCM	___, ___			fL
HCM	___			Pg	HCM	___			Pg	HCM	___, ___			Pg
CHCM	___, ___			g/dL	CHCM	___, ___			g/dL	CHCM	___			g/dL
RDW	___			%	RDW	___			%	RDW	___, ___			%
Reticulócito	___, ___			%	(DATA ___/___/___)					Ferritina	___			
Leucócitos					Leucócitos					Leucócitos				
Bastões					Bastões					Bastões				
Segment					Segment					Segment				
SU					SU					SU				
Urocultura					Urocultura					Urocultura				
Orientações sobre o uso					Orientações sobre o uso									
60 drágeas de sulfato ferroso					60 drágeas de sulfato ferroso									
Anotação no prontuário					Anotação no prontuário									
Solicitação de exames					Solicitação de exames									
Retirada do estudo					Retirada do estudo									
Motivo *					Motivo									

APÊNDICE D - NOMOGRAMA PARA O CÔMPUTO GRÁFICO DO ESCORE Z DE HEMOGLOBINA DE GESTANTES EM CADA SEMANA DE GESTAÇÃO

A curva 0 no nomograma abaixo representa as médias de referência da hemoglobina (Hb) em cada semana de gestação, de acordo com os valores de referência reportados pelo CDC (vide Anexo A).²⁷ As curvas acima e abaixo da curva 0 correspondem aos distanciamentos da média, respectivamente, positivos e negativos, de valores de Hb observados, sendo quantificados em unidades de desvios-padrão, conhecidas como escores Z (números indicados na extremidades direitas de cada curva).



**ANEXO A - MÉDIAS DE REFERÊNCIA DOS VALORES DE CONCENTRAÇÃO DE
HEMOGLOBINA (Hb) DE ACORDO COM A SEMANA DE GESTAÇÃO
UTILIZADAS PARA CÁLCULO DO ESCORE Z DA HB**

Week	Mean Hb	Week	Mean Hb	Week	Mean Hb
0	135	15	119	30	119
1	134	16	118	31	120
2	133	17	118	32	121
3	132	18	117	33	122
4	130	19	117	34	123
5	129	20	116	35	124
6	128	21	116	36	125
7	127	22	115	37	126
8	126	23	115	38	127
9	125	24	116	39	128
10	124	25	116	40	129
11	123	26	117	41	130
12	122	27	117	42	131
13	121	28	118		
14	120	29	118		

Fonte: Beaton e McCabe.²⁷