



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

SANDRA PEREIRA DOS SANTOS

**ESTUDO DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS DE LESÃO
RENAL**

FORTALEZA

2021

SANDRA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS DE LESÃO RENAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia. Linha de Pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Orientadora: Prof. Dr^a. Romélia Pinheiro
Gonçalves Lemes

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D762e dos Santos, Sandra Pereira.

Estudo da vitamina D em pacientes com anemia falciforme: Associação com biomarcadores não convencionais de lesão renal. / Sandra Pereira dos Santos. – 2021.
49 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Mestrado Profissional em Saúde da Família, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves .

1. Anemia falciforme. 2. vitamina D. 3. KIM-1. 4. MCP-1. 5. Hidroxiureia. I. Título.

CDD 610

SANDRA PEREIRA DOS SANTOS

ESTUDO DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME:
ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES NÃO CONVENCIONAIS DE LESÃO RENAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Farmácia Linha de Pesquisa: Farmácia Clínica e Vigilância Sanitária.

Aprovada em:29/03/2021

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dr. Romélia Pinheiro Gonçalves.(orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profª. Dra Rosângela Pinheiro Gonçalves
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Profª. Drª. Renata Eleutério
Centro Universitário Christus (Unichristus)

Dedico esse meu trabalho aos meus pais Maria de Lourdes e Joaquim (*in memoriam*) por sempre acreditarem em mim e por abdicarem da sua vida pelos seus filhos. Aos meus irmãos (Sérgio e Sidney) pelo apoio e incentivo. Ao meu marido (Túlio) e aos meus filhos (Maria Clara e João Pedro) pelo carinho e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me dado forças para chegar até aqui, pois sem Ele nada era possível.

À Prof. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves, pela orientação, pelas valiosas sugestões, pelo apoio, pela disponibilidade e pela constante empatia que a torna um ser humano ímpar.

Aos professores participantes da banca examinadora Dr Tiago Lima Sampaio, Dr^a. Rosângela e Dr^a. Renata Eleutério pela compreensão, pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários do laboratório do HEMOCE que sempre se mostraram disponíveis a ajudar.

Aos amigos do LACT e do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas pela colaboração, organização e disponibilidade.

Aos professores do programa de pós graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram para a minha formação.

Aos familiares e amigos pelo apoio, pela confiança e pelo incentivo durante toda essa jornada.

Aos meus amigos de profissão e de vida que sempre me incentivaram e acreditaram em mim, em especial a Laís Masullo, Tainá Osterno, Herene Lucena, Marcos Antônio e Francisca Alves (Thesca).

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

“O Senhor é o meu pastor e nada me faltará”

(Salmo 23)

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária caracterizada por uma mutação pontual no gene da beta globina gerando uma hemoglobina anormal (HbSS). A lesão renal aguda (LRA) é frequentemente observada na AF. A deficiência de vitamina D nessa doença está associada à LRA. Uma vez que o rim é o principal órgão envolvido na produção de formas bioativas de vitamina D, a existência de doença renal crônica se torna um importante fator de risco para o desenvolvimento da deficiência dessa vitamina. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar a associação dos níveis de vitamina D com os biomarcadores não convencionais de lesão renal em pacientes com AF. Trata-se de um estudo transversal, descritivo e analítico realizado no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. Participaram da pesquisa 51 pacientes adultos com diagnóstico de AF. O grupo controle foi constituído por 17 indivíduos adultos saudáveis (HbAA) doadores de sangue. Os pacientes com AF foram estratificados em 3 grupos de acordo com os níveis de vitamina D, com o uso ou não de Hidroxiureia e em relação à frequência de crises vaso-oclusivas. A deficiência da vitamina D foi de 13,72% dos pacientes, enquanto a insuficiência em 31,37% e suficiência em 54,91%. Ainda, foi observado níveis superiores de vitamina D em pacientes em comparação ao grupo controle, não havendo influência do uso de HU. Os níveis urinários de KIM-1 nos pacientes foram mais que o dobro dos obtidos no grupo controle. Destaca-se ainda que houve diferença nos níveis urinários de MCP-1, no qual os pacientes apresentaram concentrações urinárias de $160,69 \text{ pg/mL-Cr} \pm 202,61$ enquanto o grupo controle $64,24 \text{ pg/mL-Cr} \pm 63,47$. Houve associação entre os níveis séricos de vitamina D e os níveis urinários do biomarcador KIM-1, a qual pode se observar uma tendência de aumento nos níveis de KIM-1 nos pacientes com deficiência de vitamina D. Foi realizada uma curva ROC objetivando a avaliação de sensibilidade e especificidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1. O resultado se mostrou estatisticamente significativo para KIM-1 e para MCP1, demonstrando que pacientes com anemia falciforme e com baixos níveis séricos de vitamina D podem apresentar 70% de probabilidade de desenvolver doença renal. Conclui-se que não houve relação da deficiência da vitamina D com o uso da HU e nem com a frequência de crises de vaso oclusão. Porém a deficiência de vitamina D teve uma relação com os biomarcadores não convencionais de lesão renal KIM-1 e MCP-1, em pacientes com AF

Palavras chaves: anemia falciforme, vitamina D, KIM-1, MCP-1, Hidroxiureia

ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited disease characterized by a point mutation in the beta globin gene generating an abnormal hemoglobin (HbSS). Acute kidney injury (AKI) is often seen in PA. Vitamin D deficiency in this disease is associated with AKI. Since the kidney is the main organ involved in the production of bioactive forms of vitamin D, the existence of chronic kidney disease becomes an important risk factor for the development of vitamin D deficiency. Thus, the present study aimed to assess the association of vitamin D levels with unconventional biomarkers of kidney injury in patients with SCA. This is a cross-sectional, descriptive and analytical study carried out at the Hematology Service of the Hospital Universitário Walter Cantídio. Fifty-one adult patients diagnosed with SCA participated in the research. The control group consisted of 17 healthy adult individuals (HbAA) blood donors. SCA patients were stratified into 3 groups according to vitamin D levels, with or without the use of Hydroxyurea and in relation to the frequency of vaso-occlusive crises. Vitamin D deficiency was 13.72% of patients, while insufficiency in 31.37% and sufficiency in 54.91%. In addition, higher levels of vitamin D were observed in patients compared to the control group, with no influence from the use of HU. Urinary KIM-1 levels in patients were more than double those obtained in the control group. It is also noteworthy that there was a difference in the urinary levels of MCP-1, in which the patients had urinary concentrations of $160.69 \text{ pg / mL-Cr} \pm 202.61$ while the control group $64.24 \text{ pg / mL-Cr} \pm 63, 47$. There was an association between serum vitamin D levels and urinary levels of the KIM-1 biomarker, which can be observed a tendency to increase KIM-1 levels in patients with vitamin D deficiency. of sensitivity and specificity of the KIM-1 and MCP-1 biomarkers. The result proved to be statistically significant for KIM-1 and MCP1, demonstrating that patients with sickle cell anemia and with low serum levels of vitamin D may have a 70% chance of developing kidney disease. It was concluded that there was no relationship between vitamin D deficiency and the use of HU, nor with the frequency of vessel occlusion crises. However, vitamin D deficiency was related to the unconventional biomarkers of kidney injury KIM-1 and MCP-1, in patients with SCA

Keywords: sickle cell anemia, vitamin D, KIM-1, MCP-1, hydroxyurea

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mutação do gene da β globina.....	19
Figura 2 – Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	21
Figura 3 – Modelo de desenvolvimento de nefropatia falciforme.....	23
Figura 4 – Metabolismo da Vitamina D.....	26
Figura 5 – Esquema de estratificação dos pacientes com Anemia Falciforme.....	30
Figura 6 - Dosagem dos níveis de vitamina D em pacientes com anemia Falciforme	35
Figura 7 - Dosagens dos níveis séricos de creatinina e de ureia em pacientes com Anemia Falciforme.....	36
Figura 8 - Dosagens de proteinúria e albumnúria em pacientes com AF em comparação com grupo controle.....	37
Figura 9 - Níveis urinários de KIM-1 e MCP-1 em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	37
Figura10 - Dosagem de biomarcador KIM-1 em pacientes com diferentes níveis séricos de vitamina D.....	38
Figura 11 - Avaliação da especificidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1 e níveis de vitamina D.....	39

LISTA DE QUADRO

Quadro 1 – Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em 14 - estados que realizaram o teste de triagem neonatal (“teste do pezinho”).....	20
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas dos pacientes com Anemia Falciforme e grupo controle.....	34
Tabela 2 – Nível de vitamina D e perfil hematológico dos pacientes com Anemia Falciforme.....	34
Tabela 3 – Taxa de Filtração Glomerular e dosagens de biomarcadores de lesão renal em pacientes com Anemia Falciforme e grupo controle.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-DHC	7-dehydrolesterol
DF	Doença Falciforme
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DR	Doença Renal
DRC	Doença Renal Crônica
E.P.M.	Erro Padrão da Média
EDTA	Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético
ELISA	Imunoensaio Ligado à Enzima
FGF 23	Fator de Crescimento Fibroblástico 23
GLU	Ácido Glutâmico
HbA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Performance
HU	Hidroxiuréia
IRA	Injúria Renal Aguda
KIM-1	Kidney Injury Molecule-1
MCP-1	Peptídeo-1 Quimiotático para Monócitos
NO	Óxido Nítrico
TFG	Taxa de Filtração Glomerular
UVB	Ultravioleta B
VAL	Valina

VDBP Proteína Ligadora de Vitamina D

VIT. D Vitamina D

LISTA DE SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
p	Significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	Hemoglobinopatias	18
1.2	Anemia Falciforme	18
1.2.1	<i>Epidemiologia</i>	19
1.2.2	<i>Fisiopatologia</i>	20
1.2.3	<i>Tratamento</i>	22
1.3	Lesão Renal	23
1.3.1	<i>Marcadores de lesão renal</i>	24
1.4	Vitamina D	25
1.5	Anemia Falciforme, Lesão Renal e Vitamina D	27
2	OBJETIVOS	28
2.1	Objetivo geral	28
2.2	Objetivos específicos	28
3	MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1	Considerações éticas	29
3.2	Local de Estudo	29
3.3	Desenho do Estudo	29
3.4	Seleção da Amostra	30
3.4.1	<i>Critério de Inclusão</i>	30
3.4.2	<i>Critério de Exclusão</i>	31
3.5	Coleta de dados	31
3.6	Coleta de Amostras	31
3.7	Dosagem de vitamina D	31
3.8	Avaliação do escore da Hemoglobina Fetal	32
3.9	Avaliação da função renal	32
3.9.1	<i>Dosagem de Creatinina urinária</i>	32
3.9.2	<i>Dosagem de Proteinúria</i>	32
3.9.3	<i>Dosagem de Albuminúria</i>	32
3.9.4	<i>Dosagem de MCP-1 e KIM-1</i>	33
3.10	Análises estatísticas	33
4	RESULTADOS	34

5	DISCUSSÃO.....	40
6	CONCLUSÃO.....	44
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

INTRODUÇÃO

1.1 Hemoglobinopatias

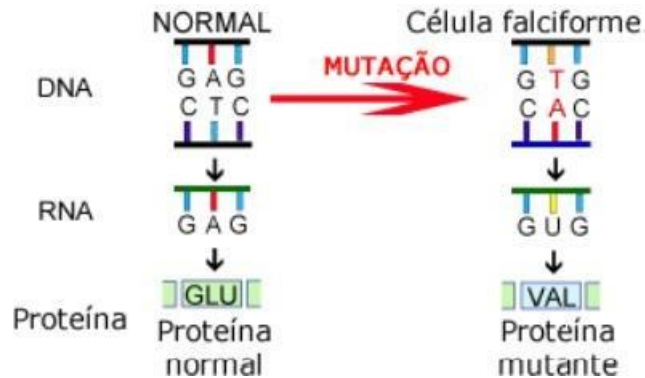
Hemoglobinopatia, também conhecida como distúrbio hereditário da hemoglobina humana, é o nome dado ao grupo de doenças autossômicas recessivas que compreendem as talassemias, doenças falciformes, hemoglobinas instáveis e hemoglobinas variantes com alterações funcionais. De uma forma geral as hemoglobinopatias podem ser divididas por aquelas que são decorrentes do desequilíbrio das concentrações de globina alfa (α) e beta (β) como no caso das talassemias e aquelas que resultam de anormalidade estrutural em uma das cadeias de globina, como no caso das doenças falciformes (OLANDO *et al*, 2000; NAOUM, DOMINGOS- BONINI, 2007).

A Doença Falciforme (DF) é uma das doenças genéticas e hereditárias mais comuns no Brasil que pode levar a dano irreversível em múltiplos órgãos. Agrupa um conjunto de genótipos onde predomina a presença do gene da hemoglobina S (HbS), que pode ocorrer em sua forma homozigota (anemia falciforme) ou associada a outra hemoglobina mutante (C, D, E) ou a defeitos quantitativos da produção das cadeias α e β da hemoglobina (síndromes talassêmicas). A Hb. S, quando em heterozigose com a hemoglobina A (HbA), é traduzida como traço falciforme. (ARAÚJO, 2007; SPARKENBAUGK, PAWLINKI, 2013; BRASIL, 2017).

1.2 Anemia Falciforme

A anemia falciforme, expressão clínica da homozigose do gene da hemoglobina S (HbSS), é caracterizada pela substituição pontual de uma base nitrogenada, timina por adenina no sexto códon do éxon 1 no Ácido desoxirribonucleico (DNA) do cromossomo 11. A troca de bases nitrogenadas no DNA, ao invés de codificar a produção (transcrição) do aminoácido ácido glutâmico, irá, a partir daí, determinar a produção do aminoácido valina, que entrará na posição 6 da sequência de aminoácidos que compõem a cadeia β da hemoglobina, modificando sua estrutura molecular. (Figura 1). Essa troca de aminoácidos faz com que ocorra o surgimento da uma hemoglobina S em homozigose. (GALIZA NETO, PITOMBEIRA, 2003; GUIMARÃES, 2009).

Figura 1- Mutação do gene da β globina



Fonte: Disponível em: <http://ecologia.ib.usp.br/evosite/evo101/IIIC2aCasestudy.shtml>

1.2.1 Epidemiologia

A AF é conhecida há séculos por povos de diferentes regiões da África. Apesar de sua incidência prevalecer em indivíduos desta região, estudos populacionais têm demonstrado a presença da hemoglobina S em indivíduos descendentes de popula es do Mediterrâneo, Caribe, América Central e Sul, Arábia e  ndia. (BANDEIRA, 2004; BRASIL, 2015; BRASI, 2016)

O Brasil apresenta popula o com diferentes origens raciais e com diversificados graus de miscigena o em suas respectivas regiões, mas observa-se que a maior prevalência da doença ocorre nas Regiões Norte e Nordeste com destaque para o estado da Bahia onde a cada 650 crianças que nascem, uma tem a DF (Quadro 1) e cada 17 crianças que nascem, uma tem o traço falciforme. Em um estudo realizado em Fortaleza por Pinheiro e colaboradores (2006), observou-se a prevalência de 4,1% de portadores de HbS no grupo de 389 recém nascidos. Estima-se que 4% da popula o brasileira tenham o traço falciforme (heterozigose simples) e que 25.000 a 50.000 pessoas tenham a doença em estado homozigótico (SS – anemia falciforme) ou condi o de heterozigotos compostos ou duplos (SC, SE, SD, S BetaTAL – doença falciforme) (BANDEIRA, 2004; BRASI, 2015; BRASI, 2016; CANÇADO, JESUS, 2007).

Quadro 1: Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em 14 estados que realizaram o teste de triagem neonatal (“teste do pezinho”)

Estados	Incidência de Doença Falciforme
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1.200
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1.400
Espírito Santo	1:1.800
Rondônia	1:2.540
Acre	1:3.480
São Paulo	1:4.000
Mato Grosso do Sul	1:8.360
Rio Grande do Sul	1:11.000
Santa Catarina e Paraná	1:13.500

Fonte: Manual de Educação-Linha de Cuidado em Doença Falciforme- Ministério da Saúde, 2009

1.2.2 Fisiopatologia

Uma das principais alterações decorrentes da mutação (Glu6Val, β S) é a substituição de um aminoácido carregado negativamente por um aminoácido de carga neutra, ou seja, há uma substituição de uma base nitrogenada do códon GAG para GTG, resultando na troca do ácido glutâmico (Glu) pela valina (Val) na posição número seis do gene. Essa substituição origina uma molécula de hemoglobina anormal denominada hemoglobina S (HbS), ao invés da hemoglobina normal chamada de hemoglobina A (HbA). A presença da valina favorece a polimerização em baixos teores de oxigênio. (MANFREDINI *et al.*, 2007).

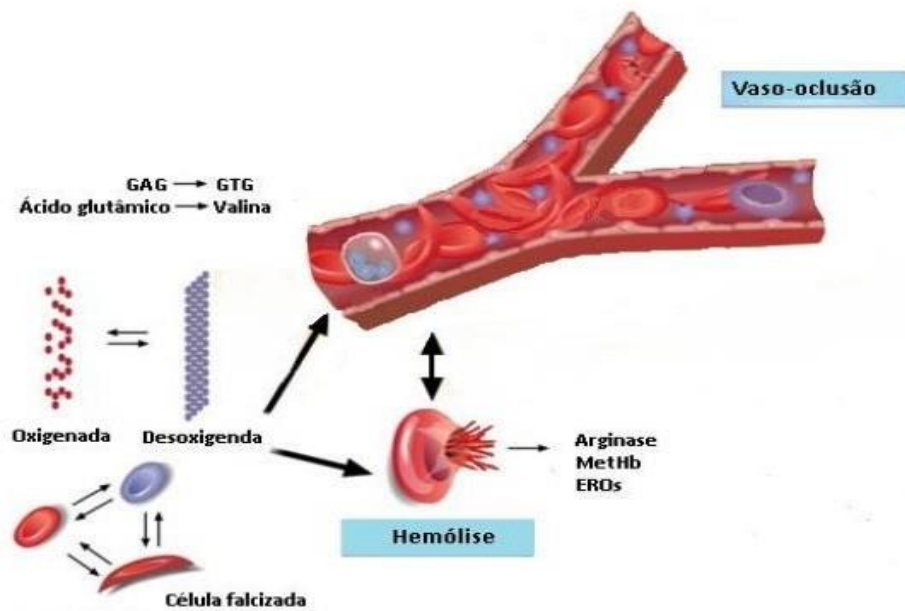
Quando em homozigose há a formação do tetrâmero patológico da hemoglobina S ($\alpha_2\beta_2^S$) cuja principal característica é a capacidade de polimerização em condições de desoxigenação. Esse polímero é capaz de esticar o formato flexível e bicôncavo das hemácias, deixando-as alongadas, rígidas e com um formato de foice, sendo esse o motivo de se chamar anemia falciforme. Esse processo de falcização da hemácia é responsável por gerar uma vaso-occlusão, bem como diversas outras complicações, tanto agudas quanto crônicas, causadas pela repetitiva isquemia e inflamação (WARE *et al.*, 2017). (Figura 2)

As alterações fisiopatológicas podem ser tanto em nível molecular e celular como também em nível tecidual. No nível molecular e celular observam-se as alterações citadas

anteriormente tais como mutações na hemoglobina, polimerização da HbS, falcização e alterações de membrana. Tais alterações, no nível tecidual em certos órgãos, culminam em adesão celular ao endotélio, hipóxia local, isquemia, inflamação, lesão microvascular, ativação da coagulação e depleção de Óxido Nítrico (NO). Essas alterações levam a importantes manifestações que são crises dolorosas, anemia hemolítica e insuficiência de múltiplos órgãos (ZAGO, PINTO, 2007).

A ocorrência de vaso oclusão, principalmente em vasos de pequeno calibre, representa o evento fisiopatológico determinante na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com AF, o que demonstra seu impacto na mortalidade e morbidade desses pacientes. Úlceras de membros inferiores, crises hemolíticas, crises álgicas, síndrome torácica aguda, seqüestro esplênico, priapismo, necrose asséptica de fêmur, retinopatia, insuficiência renal crônica, auto-esplenectomia, acidente vascular cerebral, hipertensão pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), asma, artrite reumatoide, fibromialgia, dentre outros, são alguns sinais e sintomas observados em pacientes com AF. (GALIZA NETO, PITOMBEIRA 2003; BALLAS, 2013). As dores em decorrência das crises vaso oclusivas podem ser acompanhadas por febre e leucocitose. (REES, GIBSON, 2011)

Figura 2: Fisiopatologia da Anemia Falciforme



Fonte: disponível em <http://murphylaboratory.com/?p=491> (adaptado)

Nota: O esquema mostra o início da fisiopatologia da AF com a substituição do aminoácido na sexta posição fazendo com que a HbS passe do estado oxigenado para desoxigenado, alterando a forma da hemácia de um disco bicôncavo para foice, resultando em um processo de hemólise e vaso oclusão.

1.2.3 Tratamento

O tratamento da AF consiste no uso de hidroxiuréia (HU) que é um fármaco que atua na inibição da enzima ribonucleotídeo redutase, o que leva ao aumento da produção de hemoglobina fetal (HbF), da hidratação do glóbulo vermelho e da taxa hemoglobínica, além de diminuição da hemólise, maior produção de óxido nítrico e diminuição da expressão de moléculas de adesão. Até o momento, a HU é considerada a terapia farmacológica mais eficaz para a doença falciforme (PALTT, 2008; GULBIS, 2005; BRASIL, 2013) Na prática clínica, a HU é capaz de reduzir o número de crises álgicas de em média 4,5 episódios por ano para 2,5 episódios por ano (CHARACHE, 1995).

Como as infecções são as complicações mais frequentes nos indivíduos com AF, é de rotina o uso de vários medicamentos tais como antibióticos, vitaminas e antioxidantes com a finalidade de reduzir os sinais e sintomas da doença (IANNONE *et al*, 2005; DI NUZZO, FONSECA, 2004).

1.3 Lesão Renal

Como relatado anteriormente, a lesão renal é uma das principais complicações relacionadas com a AF. A presença dessa nefropatia na DF foi descrita em 1910, quando Herrick fez o primeiro relato de um jovem estudante negro com “anemia e achados de glóbulos vermelhos em forma de foice”, associado a alterações do volume e densidade da urina (CRUZ, 2019).

O aparecimento de anormalidades renais inicia-se na infância e acomete 1/3 dos adolescentes e adultos jovens, sendo causa importante de mortalidade em adultos. (LIMA *et al*, 2015; MAGALHÃES, 2007).

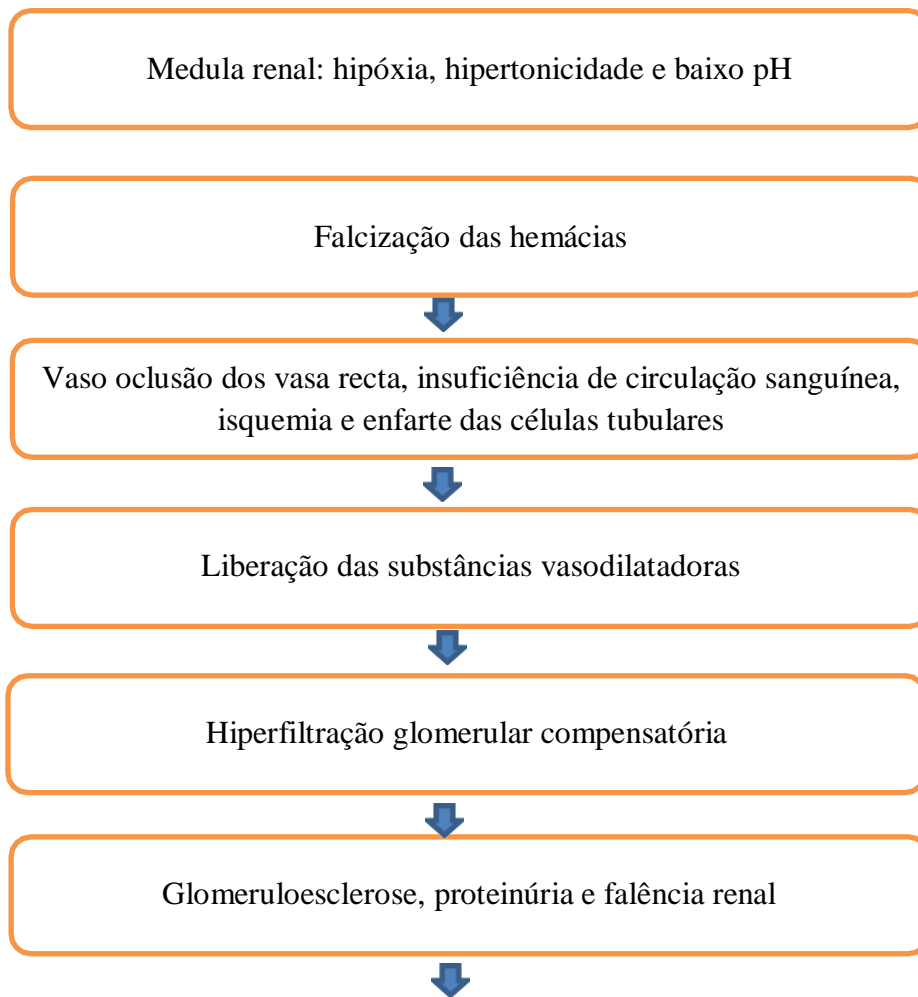
As alterações na porção medular do rim são muito frequentes, uma vez que a medula renal apresenta condições ideais para falcização por ser uma área caracterizada por anóxia, hipertonicidade e baixo pH, condições favoráveis ao fenômeno de falcização. (LIMA *et al*, 2015; MAGALHÃES, 2007).

A resultante falcização da hemácia culmina com vaso-oclusão com insuficiência de circulação sanguínea, isquemia, necrose papilar nos rins, microinfarto e enfarte das células tubulares. O resultado é uma perda quase completa dos *vasa recta* (capilares peritubulares

especializados), sendo os poucos vasos sanguíneos medulares existentes marcadamente dilatados e em configuração de espiral. (LIMA *et al*, 2015; ATAGA *et al*, 2014).

O desenvolvimento da doença ocorre com a liberação de substâncias vasodilatadoras - prostaglandina e óxido nítrico – como consequência da isquemia medular. Essas substâncias atuam por meio de mecanismo de feedback com o glomérulo, causando aumento na taxa de filtração glomerular (TFG) que, com o tempo, resulta em glomeruloesclerose, proteinúria e eventual falência renal. (LIMA *et al*, 2015) (Figura 3)

Figura 3: Modelo de desenvolvimento de nefropatia falciforme



Fonte: Fisiopatologia da doença renal crônica em adultos com doença falciforme, (Lima *et al*, 2015) (adaptado)

As manifestações clínicas mais frequentemente associadas são: proteinúria com ou sem síndrome nefrótica, hematúria, hipostenúria, prevalência aumentada de infecção urinária

(principalmente, *E.Coli* e *Klebsiella/enterobacter sp*), dentre outras. A hipostenúria, que é a incapacidade de concentrar a urina sob condições de privação de água, é a anormalidade renal clinicamente mais conhecida na DF e a primeira manifestação de envolvimento dos rins associada à falcização (ATAGA, ORRINGER, 2000; CRUZ, 2019, LIMA *et al*, 2015, MAGALHÃES, 2007).

1.3.1 Marcadores de lesão renal

Para avaliação clínica e laboratorial dos pacientes com Injúria Renal Aguda (IRA) são utilizadas as dosagens de biomarcadores convencionais como creatinina sérica, TFG, ureia e proteinúria; e como avaliação clínica são analisados os sinais e sintomas de uremia e a diminuição do débito urinário. A creatinina é o biomarcador mais utilizado em nefrologia, porém tem meia-vida sérica de 4 horas e leva até 40 horas para que sua concentração revele a IRA, ou seja é um teste específico, mas tardio, pouco sensível e impreciso. Ela se altera apenas quando já existe perda de aproximadamente 50% da função renal (IBRAHIM, 2021; MAGRO, VATTIMO, 2007)

Com o avanço da tecnologia vários novos biomarcadores estão sendo desenvolvidos para que seja possível a detecção precoce de IRA, a identificação de lesões subclínicas, o fornecimento de informação prognóstica do curso da doença, a identificação dos segmentos mais afetados, a avaliação da resposta para determinados tratamentos e a classificação dos pacientes de risco para lesão renal. O ideal é que esses biomarcadores sejam facilmente mensuráveis, sem interferência de outras variáveis biológicas e capazes tanto de detectar precocemente uma lesão renal, quanto de estratificar o seu risco. (SODRÉ, *et al*, 2007; IBRAHIM, 2021; MAGRO, VATTIMO, 2007; PERES *et al*, 2013).

KIM-1 (*Kidney Injury Molecule-1*) Molécula de Injúria Renal Aguda- Proteína transmembrana presente no túbulo renal proximal e é excretada na urina quando há uma lesão. Ausente em indivíduos normais e sem lesão renal. Quando há uma elevação nos níveis dessa proteína sugere-se o início de um processo patológico em células do epitélio tubular proximal, considerada, assim, um sensível marcador de lesão tubular proximal. (MAGRO, VATTIMO, 2007; IBRAHIM, 2021)

MCP-1 (*peptídeo-1 quimiotático para monócitos*): Foi descoberto que há uma associação entre o aumento de expressão de RNAm de um peptídeo-1 quimiotático para monócitos (MCP-1) com a presença de lesão por isquemia-reperfusão. Assim sendo, o MCP-1 tem sido avaliado como biomarcador para processos inflamatórios mononucleares que ocorrem

após a IRA induzida por isquemia. Em estudos adicionais, o MCP-1 foi reportado como uma quimiocina potente produzida pelas células renais e que age como mediador de lesão renal aguda isquêmica e tóxica. (PERES *et al*, 2013)

1.4 Vitamina D

Como a AF pode resultar em comprometimento renal, a produção de substâncias biotivas a partir de substâncias inertes ocorridas a nível renal, poderá ser deficiente. Um exemplo é a vitamina D.

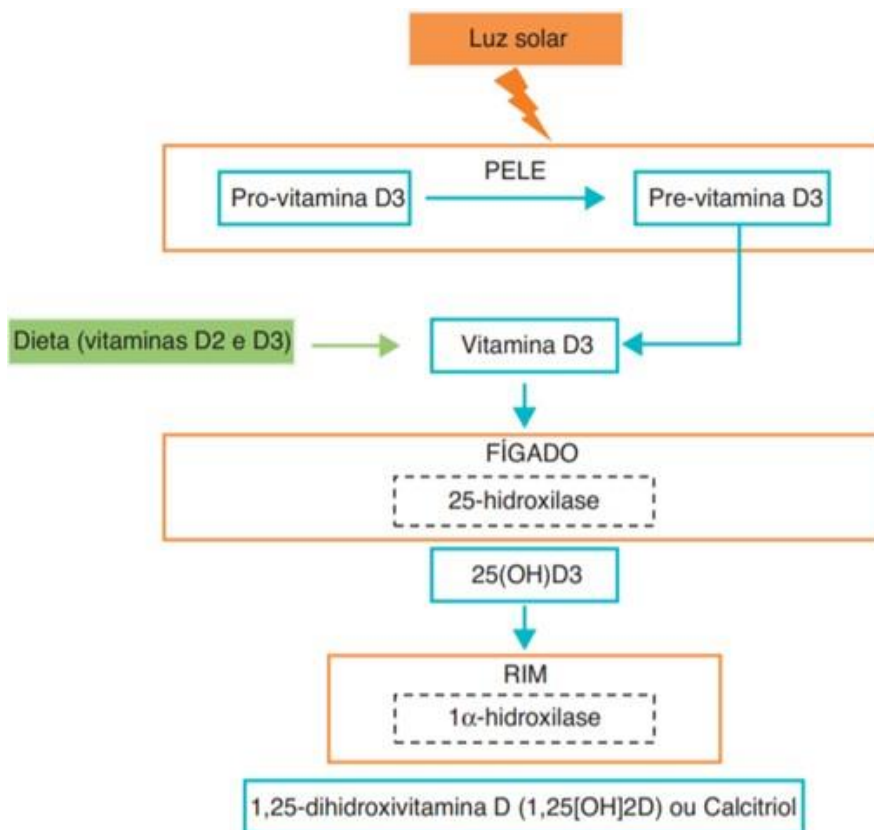
A vitamina D foi inicialmente caracterizada como um fator capaz de curar o raquitismo, doença caracterizada por desmineralização óssea e deformidades esqueléticas. É uma vitamina importante na manutenção da homeostase normal do cálcio e do fósforo, sendo única entre as vitaminas, pois funciona como uma hormona e pode ser sintetizada na pele a partir da exposição à luz solar. (JORGE *et al*, 2018; CASTRO, 2011; ALVES *et al*, 2013)

Evidências recentes correlacionam níveis insuficientes ou deficientes de vit. D com um risco aumentado de desenvolvimento de uma ampla variedade de patologias não ósseas como doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, esclerose múltipla, demência, doenças autoimunes, acidente vascular cerebral, artrite reumatóide, doenças infecciosas, aumento ao risco de neoplasias, dentre outras. (INDA FILHO, 2013; ALVES *et al*, 2013; DINIZ *et al*, 2012, BARRETO, STINGHEN, 2020)

A vitamina D que vem da pele ou da dieta é biologicamente inerte. A síntese endógena inicia-se nas camadas profundas da epiderme onde se encontra o precursor 7-Dehydrocolesterol (7-DHC). A radiação ultravioleta B (UVB) promove a fotólise do 7-DHC passando a pré-vitamina D3. Esta é termoinstável e sofre reação de isomerização induzida pelo calor, convertendo-se na vitamina D3 (colecalfiferol). Ao atingir o fígado, as vitaminas D2 (ergocalciferol) e D3 sofrem hidroxilação pelo citocromo P450 e dão origem à 25-hidroxitamina D, que é a forma predominante na circulação. No sangue, cerca de 85 a 90% da 25-hidroxitamina D se encontra ligada à proteína ligadora de vitamina D (VDBP). Ao atingir os tecidos-avlos, a 25-hidroxitamina D é convertida pela enzima 1 α -hidroxilase em 1 α ,25-di-hidroxitamina D, que é a forma metabolicamente ativa da vitamina. (Figura 4). (JORGE *et al*, 2018; CASTRO, 2011; ALVES *et al* 2013).

Como o rim é o principal órgão envolvido na produção de formas bioativas de vitamina D, a existência de doença renal crônica é um importante fator de risco para o desenvolvimento da deficiência dessa vitamina. Uma redução na taxa de filtração glomerular (TFG) limita o fornecimento 25-hidroxivitamina D e conseqüentemente há a redução da suabiodisponibilidade fazendo com que haja um déficit na produção de $1\alpha,25$ -di-hidroxivitamina. Outro ponto importante é com relação aos níveis de hormônio fosfatúrico Fator de Crescimento Fibroblástico 23 - do inglês fibroblast growth factor 23- (FGF-23). Tem sido evidenciado nos casos de Doença Renal Crônica (DRC) que há um aumento nos níveis de FGF-23 e que essa proteína suprime diretamente a atividade e expressão da 1α -hydroxylase. (INDA FILHO, 2013).

Figura 4. Metabolismo da Vitamina D



Fonte: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1646343913000084>

1.5 Anemia Falciforme, Lesão Renal e Vitamina D

A doença renal é uma complicação frequente associada aos pacientes de anemia falciforme sendo necessário, assim, o monitoramento dos níveis de biomarcadores específicos para identificação precoce de alterações que possam resultar em uma lesão renal.

Os avanços tecnológicos proporcionaram a descoberta de vários biomarcadores, porém nem todos os pacientes tem acesso a eles. Esse fato motiva a necessidade de pesquisas que possam contribuir com a descoberta de alternativas diagnósticas, ou de monitoramento clínico, que sejam tanto de fácil acesso a população em geral como também possuam embasamento científico.

O estudo dos níveis séricos de vitamina D em associação com os biomarcadores de lesão renal pode contribuir para um novo cenário de monitoramento e tratamento dessa nefropatia em pacientes com AF. Além disso os resultados e as conclusões inerentes ao estudo podem servir de base para o desenvolvimento de outras pesquisas na área.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Associar os níveis de vitamina D com biomarcadores não convencionais de lesão renal em pacientes com anemia falciforme.

2.2 Específicos

- Avaliar os níveis de vitamina D em pacientes com anemia falciforme e comparar quanto aos aspectos clínicos, sexo, idade e uso de hidroxiuréia
- Avaliar os níveis de vitamina D e correlacionar com os níveis de biomarcadores de lesão renal não convencionais KIM-1 e MCP-1
- Analisar o perfil clínico e hematológico dos pacientes com anemia falciforme.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio - HUWC – da Universidade Federal do Ceará e obteve aprovação sob o parecer de número 1.228.634. Todos os participantes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e concordaram em participar ao assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aplicado antes da coleta de amostras.

3.2. Local de Estudo

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHGDH) em conjunto com o Laboratório de Análises Clínicas do HEMOCE, onde foram realizadas as dosagens de vitamina D e com o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica da UFC, onde foram realizadas as dosagens dos biomarcadores de função renal.

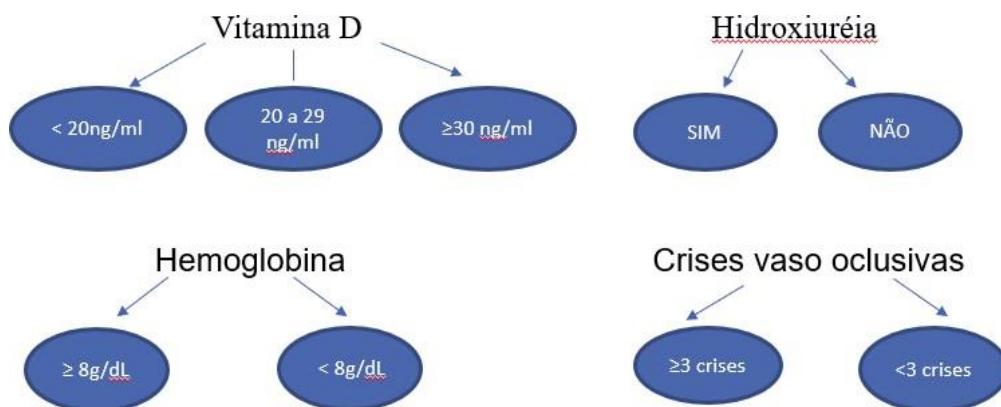
3.3 Desenho do Estudo

Este é um estudo transversal, descritivo e analítico realizado no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC – no período de março de 2019 a dezembro de 2020. Participaram da pesquisa 51 pacientes adultos com Anemia Falciforme, previamente diagnosticados por eletroforese de hemoglobina e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de Ballas (2011). Participaram do grupo controle, 17 indivíduos adultos saudáveis (HbAA). Ambos, pacientes e controles, foram pareados de acordo com idade e sexo.

Os pacientes foram estratificados conforme abaixo:

- 3 grupos de acordo com os níveis de vitamina D: deficiência <20 ng/ml; insuficiência 20-29 ng/ml; e suficiência ≥ 30 ng/ml (HOLICK, 2007).
- 2 grupos de acordo com o uso ou não de Hidroxiureia.
- 2 grupos de acordo com os níveis de hemoglobina (Hb): anemia leve a moderada (Hb ≥ 8 g/dL) e anemia grave (Hb < 8g/dL) (ABAN *et al*, 2017).
- 2 grupos com relação à quantidade de crises vaso-oclusivas: dor frequente (≥ 3 crises de dor intensa e/ou grave que exigiram cuidados) e dor não frequente (<3 crises de dor pouco frequente) (DARBARI *et al*, 2012).

Figura 5: Esquema de estratificação dos pacientes com AF



3.4 Seleção da Amostra

3.4.1 Critério de Inclusão

- Pacientes com AF:
 - Pacientes adultos (>18 anos) de ambos os sexos, com diagnóstico de Anemia Falciforme confirmado previamente por eletroforese de hemoglobina e/ou por HPLC
 - Pacientes em estado estacionário da doença, de acordo com os critérios de Ballas (2011): ausência de episódios de dores agudas e/ou doenças infecciosas nas últimas quatro semanas precedentes ao estudo; ausência de admissão hospitalar nos últimos três dias precedentes ao estudo; ausência de transfusão sanguínea durante os últimos quatro meses precedentes ao estudo.

- Grupo controle: indivíduos adultos (>18 anos) de ambos os sexos, aparentemente saudáveis

3.4.2 Critério de Exclusão

- Pacientes que não apresentaram confirmação de Anemia Falciforme após análise em prontuário.

- Pacientes diagnosticados com outros tipos de anemias.
- Pacientes gestantes.
- Pacientes acometidos com doença hepática ou renal.
- Pacientes em uso de vitamina D.

3.5 Coleta de dados

Os dados clínicos (frequência de crises dolorosas), epidemiológicos e laboratoriais (hemograma completo, dosagem de creatinina e ureia e taxa de filtração glomerular – TFG) foram obtidos por consulta em prontuários. Além disso, foram observados, de maneira individual, parâmetros como idade, sexo, utilização ou não de suplementação de vitamina D e Hidroxiureia

3.6 Coleta de Amostras

Para a dosagem de vitamina D foram coletados 4 mL de sangue por punção venosa em tubo com gel separador.

Para a quantificação dos biomarcadores de função renal (KIM-1, MCP-1, proteína, creatinina e albumina) foram coletados 10 mL de urina recente.

As amostras foram separadas e guardadas em freezer -80°C até a realização das análises.

3.7 Dosagem de vitamina D

Os níveis séricos de vitamina D foram determinados por metodologia de imunensaio quimioluminescente competitivo (CLIA) direto e definidos como: deficiência (<20 ng/mL), insuficiência (entre 20 e 29 ng/mL) e suficiência (≥ 30 ng/mL) (HOLICK, 2007).

O teste consiste na determinação quantitativa da 25 OH vitamina D total no soro. Durante a primeira incubação, a 25 OH vitamina D é dissociada da sua proteína de ligação e liga-se ao anticorpo específico na fase sólida. Ao fim de 10 minutos, é adicionado o marcador vitamina D ligado a um derivado de isoluminol. Após uma segunda incubação de 10 minutos, o material não ligado é removido com um ciclo de lavagem. Subsequentemente, os reagentes iniciadores são então adicionados e inicia-se uma reação quimioluminescente rápida. O sinal

de luz é medido por um fotomultiplicador como unidades de luz relativas (RLU), sendo inversamente proporcional à concentração de 25 OH vitamina D presente.

3.8. Avaliação da Hemoglobina Fetal

Os resultados foram obtidos dos prontuários dos pacientes.

3.9. Avaliação da função renal

Para a avaliação da função renal dos pacientes foram realizadas dosagens de creatinina urinária, proteinúria, albuminúria, KIM-1 e MCP-1 obtidas a partir de amostras de urina recentes e obedecendo a metodologia sugerida pelo fabricante.

3.9.1 Dosagem de Creatinina

Determinada pela formação de um complexo (cromogênio) de cor vermelha resultante da reação entre creatinina e picrato em meio alcalino – reação de Jaffé – e analisada por espectrofotometria (Cobas C 111, Roche®). Os valores obtidos foram expressos em mg/dL

3.9.2 Dosagem de Proteinúria

Determinada pelo método Vermelho de Pirogalol (Sensiprot - Labtest®) que reage com o molibdato de sódio formando um complexo que quando combinado com a proteína em meio ácido desenvolve um cromóforo de cor azul que é analisado por espectrofotometria. Os resultados foram normalizados pela creatinina urinária e expressos em mg/dL-Cr.

3.9.3 Dosagem de Albuminúria

Determinada pelo método de imunoturbidimetria automatizada (Cobas C 111, Roche®). Essa técnica consiste em medir a diminuição da luz ao passar por um complexo antígeno-anticorpo, ou seja, a imunoturbidimetria mede o quanto a solução antígeno-anticorpo absorve da luz e o quanto ela deixa passar, sendo que a luz não difundida (a absorvida) é medida. Os resultados obtidos foram normalizados pela creatinina urinária e expressos em mg/dL-Cr.

3.9.4 Dosagens de KIM-1 e MCP-1

Determinadas por técnica de imunoenensaio ligado à enzima (ELISA) utilizando a técnica comercial kit Boster Immunoassays®. A técnica consiste em utilização de placas de microtitulação que foram pré-revestidas, isoladamente, com anticorpo monoclonal específico para MCP-1 e para KIM-1 e sensibilizadas pela adição de amostras de urina. Os procedimentos de análises foram executados de acordo com a orientação do fabricante, onde são realizados processos tais como: incubação em 37 ° C, lavagem das placas com tampão apropriado, adição de anticorpos específicos, seguido de novo processo de incubação, adição de reagente colorimétrico e solução de parada, finalizando com leitura a 450 nm por espectrofotometria. Os resultados das concentrações foram normalizados pela creatinina urinária e expressos em pg/mL-Cr.

3.10. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *IBM-SPSS v22*. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.). O teste de Levene e o teste de Shapiro-Wilk foram utilizados para analisar a variância e a normalidade das amostras, respectivamente. As médias entre dois grupos foram comparadas pela realização do teste *t-Student*. Foi realizada a análise de variância de Welch (ANOVA de Welch) para a comparação das médias entre três grupos, seguida por teste *post hoc* de Games-Howell. O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a associação dos níveis de vitamina D com os níveis de Hb; número de crises vaso-oclusivas e o uso de HU. A curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e AUC (*Area under the ROC curve*) foram utilizadas para avaliar a sensibilidade e a especificidade. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

As características demográficas dos pacientes com AF e do grupo controle estão resumidas na tabela 1.

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes com Anemia Falciforme e grupo controle

	Pacientes (n= 51)	Controle (n= 17)	valor de p
Idade	32,59 ± 1,40	28,65 ± 2,41	0,163
Sexo: n (%)			
Masculino (%)	20 (39,22%)	3 (17,64%)	N/A
Feminino (%)	31 (60,78%)	14 (82,35%)	N/A
Uso de HU, n	34 (66%)	N/A	N/A

HU: Hidroxiureia

N/A: Não aplicável

Foram analisados 51 pacientes diagnosticados com AF. A média de idade foi 32,59 ± 1,4 anos, a maioria pertencia ao sexo feminino e cerca de 66% estavam em uso de HU. As características clínicas do estudo estão reunidas na Tabela 1. Do total, (78,4%) pacientes apresentaram anemia leve a moderada, enquanto 11 (21,6%) apresentaram anemia grave (Tabela 2).

Tabela 2. Características bioquímicas e hematológicas dos pacientes com Anemia Falciforme. Os valores foram representados como média ± desvio padrão e frequência (%).

	HbSS (n= 17)	HU HbSS (n= 34)	Total (n=51)	valor de p
Vitamina D (ng/mL)	42,71 ± 20,97	35,16 ± 19,9	37,98 ± 19,11	0,214
Deficiência, n (%)	1 (5,9%)	6 (17,6%)	7 (13,7%)	N/A
Insuficiência, n (%)	6 (35,3%)	10 (29,4%)	16 (31,4%)	N/A
Normal, n (%)	10 (58,8%)	18 (53%)	28 (54,9%)	N/A
Perfil hematológico				
Hb (g/dL)	8,9 ± 1,56	9,13 ± 1,55	9,17 ± 1,5	0,373
Anemia leve a moderada, n (%)	13 (76,5%)	27 (79,4%)	40 (78,4%)	N/A
Anemia grave, n (%)	4 (23,5%)	7 (20,6%)	11 (21,6%)	N/A
Ht (%)	25,82 ± 4,74	26,88 ± 4,36	26,52 ± 4,4	0,431
Leucócitos (x10 ³ /mm ³)	11,6 ± 3,3	9,2 ± 2,9	10 ± 3,2	0,011
Plaquetas (x10 ⁵ /mm ³)	4,05 ± 1,3	3,3 ± 1	3,59 ± 1,2	0,05
HbF (%)	12,2 ± 7	13,8 ± 4,8	13,2 ± 5,6	0,347

HbSS: pacientes com Anemia Falciforme que não fazem uso de Hidroxiureia

HU HbSS: pacientes com Anemia Falciforme em uso de Hidroxiureia

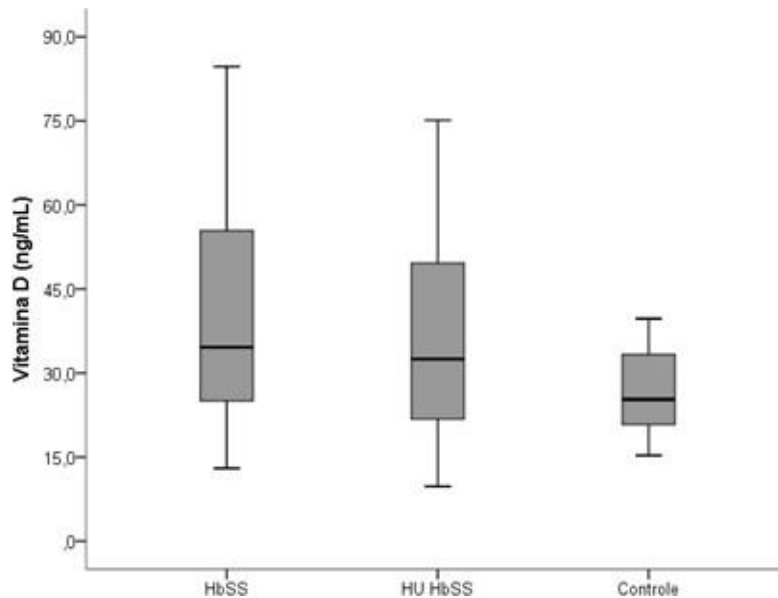
HbF: Hemoglobina F

Os pacientes com AF apresentaram níveis séricos de vitamina D de 37,98 ng/mL ± 19,11. A deficiência esteve presente em cerca de 13,72% dos pacientes, enquanto a insuficiência em 31,37% e suficiência em 54,91% (Tabela 2). Ainda, foi observado níveis

superiores de vitamina D em pacientes em comparação ao grupo controle, não havendo influência do uso de HU (HbSS: $42,71 \pm 5,08$; HU HbSS: $35,61 \pm 3,08$; controle: $26,91 \pm 1,85$; $p = 0,006$) (Figura 6).

Com relação aos parâmetros hematológicos, observou-se que os pacientes com AF em uso de HU apresentaram redução estatisticamente significativa na contagem de leucócitos ($p=0,011$). Não foi observada diferença significativa nos parâmetros de hemoglobina, hematócrito, plaquetas e HbF. (Tabela 2).

Figura 6. Dosagem dos níveis séricos de vitamina D em pacientes com Anemia Falciforme.



HbSS: pacientes sem tratamento com HU ($n = 17$); HU HbSS: pacientes em tratamento com HU ($n = 34$); Controle: indivíduos saudáveis ($n = 17$).

A taxa de filtração glomerular e dosagem dos biomarcadores de LRA estão ilustradas na Tabela 3. Observa-se que os níveis de creatinina sérica e de ureia dos pacientes foram de $0,55 \pm 0,16$ e $17,16 \pm 6,62$, respectivamente. Não houve diferença nos níveis de creatinina sérica entre os pacientes com e sem tratamento com HU (HU HbSS: $0,57 \pm 0,18$; HbSS: $0,53 \pm 0,12$; $p = 0,473$). Resultados semelhantes foram observados para a ureia (HU HbSS: $17,73 \pm 6,89$; HbSS: $16,11 \pm 6,10$; $p = 0,417$) (Figura 7).

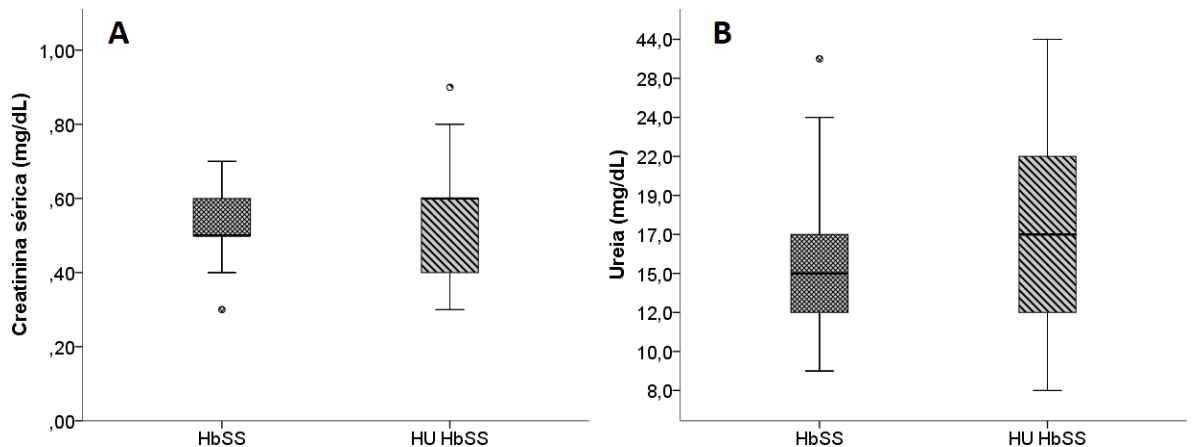
Tabela 3. Taxa de filtração glomerular e dosagens de biomarcadores de lesão renal em pacientes com Anemia Falciforme e grupo controle.

	Pacientes (n= 51)	Controle (n= 17)	valor de p
TFGe (CKD-EPI) mL/min/1,73 m ²	136 ± 21,11	N/A	N/A
Creatinina sérica (mg/dL)	0,55 ± 0,16	N/A	N/A
Ureia (mg/dL)	17,19 ± 6,6	N/A	N/A
Albuminúria (mg/dL-Cr)	223,62 ± 670,43	9,43 ± 12,02	0,195
Proteinúria (mg/dL-Cr)	46,11 ± 24,65	15,13 ± 8,35	< 0,001
KIM-1 (pg/dL-Cr)	1572,14 ± 797,86	649,28 ± 384,38	< 0,001
MCP-1 (pg/dL-Cr)	160,69 ± 202,61	64,24 ± 63,47	0,004

N/A: não aplicável

A proteinúria foi maior nos pacientes em comparação ao grupo controle (pacientes: 46,11 ± 24,65; controle: 15,13 ± 8,35; p < 0,001). Resultados semelhantes foram observados para albuminúria (pacientes: 136,01 ± 243,21; controle: 9,43 ± 12,02; p = 0,001) (Tabela 3) (Figura 8)

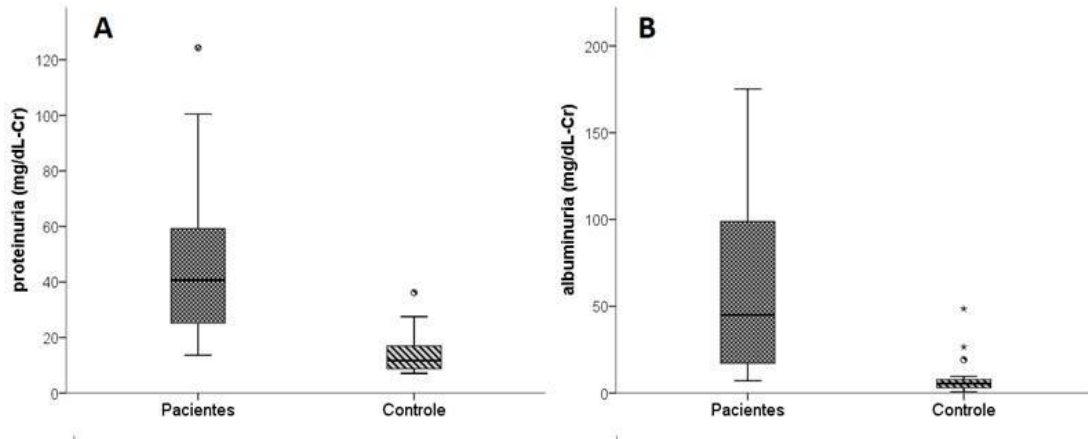
Figura 7. Dosagens Níveis séricos de creatinina e de ureia em pacientes com AF.



HbSS: pacientes sem tratamento com HU / HU HbSS: pacientes em tratamento com HU.

Os níveis urinários de KIM-1 nos pacientes com AF foram mais que o dobro dos obtidos no grupo controle. Também houve diferença nos níveis urinários de MCP-1, no qual os pacientes apresentaram concentrações urinárias de 160,69 pg/mL-Cr ± 202,61 (p < 0,001). MCP-1 (p = 0,004). enquanto o grupo controle 64,24 pg/mL-Cr ± 63,47 (Figura 9).

Figura 8- Dosagens proteinúria e albuminúria em pacientes com AF em comparação com grupo controle

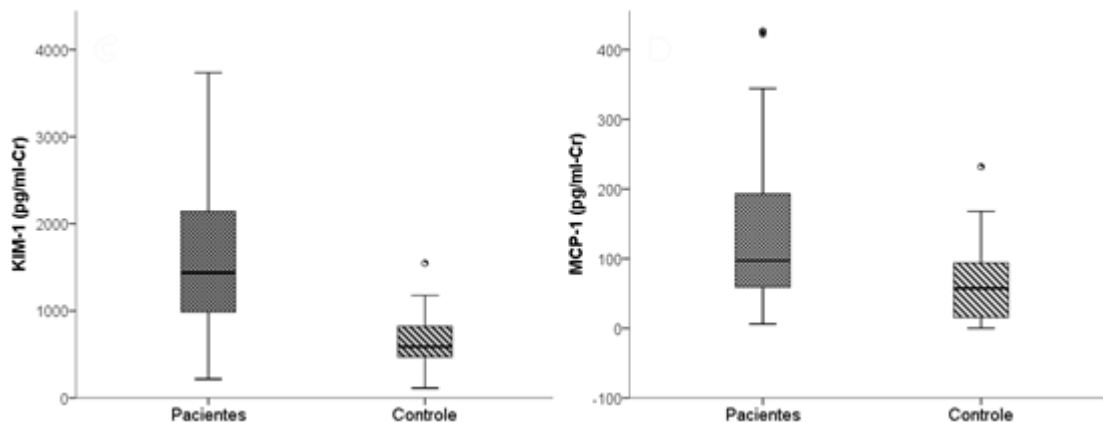


a. proteinúria ($p < 0,001$). b. albuminúria ($p = 0,001$)

Não houve associação entre os níveis de vitamina D e a gravidade de anemia nos pacientes ($\chi^2_{(2)} = 2,568$; $p = 0,253$). Resultados semelhantes foram observados entre os níveis de vitamina D e o uso de HU ($\chi^2_{(2)} = 1,213$; $p = 0,547$).

Com relação às crises vaso oclusivas, 20,5% dos pacientes com AF relataram a presença de dor frequente (≥ 3 crises de dor intensa e/ou grave por ano e que exigiram cuidados) e 79,6% dor não frequente (< 3 crises de dor pouco frequente por ano). Não houve associação entre os níveis de vitamina D e o número de crises vaso-oclusivas ($\chi^2_{(2)} = 2,474$; $p = 0,325$).

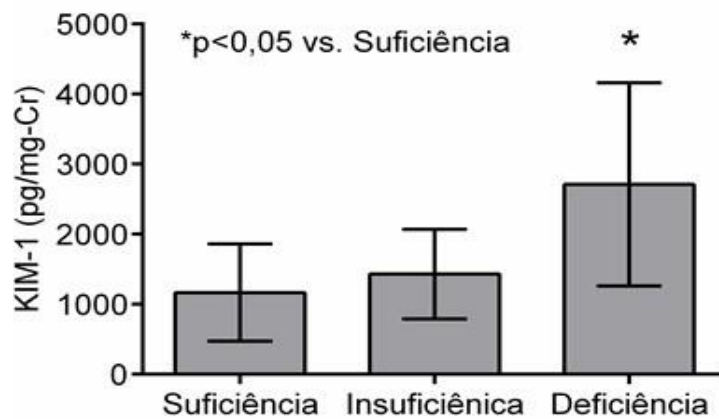
Figura 9. Níveis urinários de KIM-1 e MCP-1 em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.



KIM-1 ($p < 0,001$). MCP-1 ($p = 0,004$).

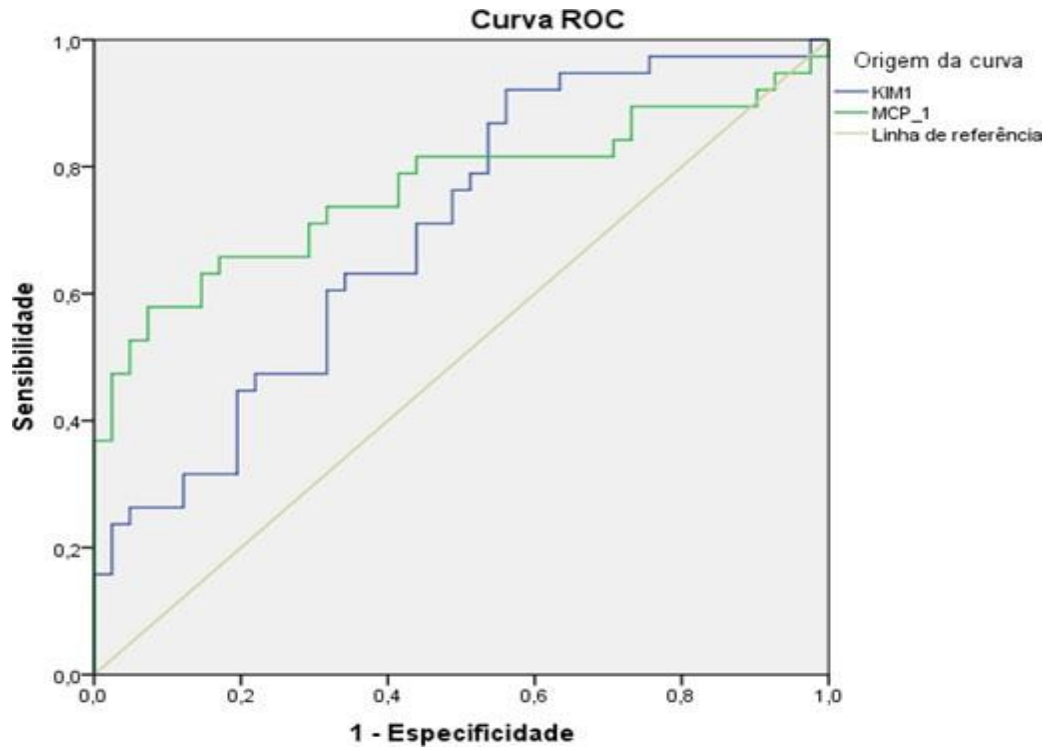
Houve associação entre os níveis de vitamina D e os níveis do biomarcador KIM-1 ($p < 0,05$), onde se observa que há uma tendência de aumento nos níveis de KIM-1 nos pacientes com deficiência de vitamina D (Figura 10)

Figura 10: Dosagem de biomarcador KIM-1 em pacientes com diferentes níveis séricos de vitamina D



Foi realizada uma curva ROC objetivando a avaliação de sensibilidade e especificidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1. Os pacientes foram dicotomizados e classificados entre suficientes (vitamina D de 30 a 100 ng/mL) e insuficientes (vitamina D < 30 ng/mL). O resultado se mostrou estatisticamente significativo tanto para o biomarcador KIM-1 (AUC = 0,700; EP 0,058; $p < 0,05$) como para o biomarcador MCP1 (AUC = 0,764; EP 0,057; $p < 0,01$) (Figura 11).

Figura 11: Avaliação da especificidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1 e níveis d de vitamina D.



5 DISCUSSÃO

A AF é uma hemoglobinopatia caracterizada pela presença de anemia, em grau variável, em decorrência da hemólise, que é um dos fenômenos relacionados com a sua fisiopatologia. (ZAGO, PINTO, 2007). O presente estudo teve como resultado a presença de anemia leve a moderada em 78,4% dos pacientes e anemia grave em 21,6%, o que está em consonância com a literatura. (DI NUZZO, FONSECA, 2004; PINTO *et al*, 2019; KATO, 2009)

A AF pode ser também considerada uma doença inflamatória crônica cuja a origem multifatorial pois envolve mecanismos relacionados com células endoteliais, eritrócitos, leucócitos e plaquetas. (ZAGO, PINTO, 2007). Pacientes com AF podem se apresentar com uma elevação do número de leucócitos e essa leucocitose é um fator de risco para síndrome torácica aguda, acidente vascular cerebral e mortalidade. (JOHNSON, TELEN, 2008).

A HU é atualmente o fármaco mais indicado para o tratamento da AF (GULBIS, 2005; PLATT, 2008) e alguns estudos relatam a redução do número de leucócitos em pacientes em uso de HU (BANDEIRA *et al*, 2014; SANTOS, 2014; PRETTO, 2017; JOHNSON, TELEN, 2008). No presente estudo, quando comparados os dois grupos de pacientes com e sem uso de HU, observou-se que os em uso de HU apresentaram redução estatisticamente significativa na contagem de leucócitos ($p=0,011$), evidenciando assim o importante papel do fármaco nos eventos inflamatórios característicos dos pacientes acometidos por essa enfermidade.

O rim é um dos órgãos mais afetados nos pacientes com AF, pois a medula renal proporciona condições propícias para que ocorra a falcização das hemácias, sendo assim a presença de DR é frequentemente encontrada nos pacientes com AF. (LIMA *et al*, 2015; MAGALHÃES, 2007; REES, GIBSON, 2011). As modificações na função renal podem não ser identificadas precocemente uma vez que os biomarcadores convencionais só se alteram quando há um dano mais avançado. No presente estudo, os resultados dos biomarcadores ureia e creatinina séricos não foram estatisticamente significantes em comparação com o grupo controle, bem como não tem teve correlação com o uso ou não de HU, resultados semelhantes foram encontrados por Santos e colaboradores (2014). A proteinúria e a albuminúria foram outros biomarcadores utilizados no estudo e os resultados encontrados foram maiores nos pacientes com AF que no grupo controle constituídos por indivíduos sem hemoglobinopatias

($p < 0,001$ em ambos os biomarcadores), esses resultados corroboram tanto com dados existentes na literatura como também com outros estudos semelhantes que demonstram a existência de comprometimento renal em pacientes portadores de AF. (SANTOS *et al*, 2014; LIMA *et al*, 2015; LAURENTINO *et al*, 2019).

A prevalência de deficiência de vitamina D em indivíduos com anemia falciforme é bastante variável, podendo ser influenciada por questões sociais, culturais e ambientais (GOODMAN *et al*, 2010; ALJAMA *et al*, 2018). Oliveira e colaboradores (2014), em seu artigo de revisão, cita que há estudos que demonstram maiores níveis sérios de vitamina D nas estações do ano com temperaturas mais elevadas, fato esse explicado pela participação da luz solar no metabolismo da vitamina D. No presente estudo a deficiência da vitamina D foi de 13,7% dos pacientes, enquanto a insuficiência em 31,4% e suficiência em 54,9%. Alguns estudos realizados reportaram prevalências de 35,7% (ADEGOKE *et al*, 2018), 60% (HAMDI *et al*, 2018) e 68% (BROWN *et al*, 2020) da deficiência de vitamina D. Os resultados, portanto, corroboram com dados da literatura em pacientes adultos com AF.

Também foi observado que os pacientes com AF em tratamento com HU mesmo tendo apresentado níveis superiores de vitamina D, não foi possível estabelecer uma relação entre essas duas variáveis. Essa ausência de associação foi anteriormente reportada em alguns estudos desenvolvidos tanto com pacientes pediátricos quanto com adultos, mas estudos futuros são necessários para sua determinação (OSWUNKO *et al*, 2011; WINTERS *et al*, 2014).

Durante a evolução clínica dos pacientes com AF são relatados episódios de dores em virtude da oclusão dos vasos de pequeno calibre pelas hemácias falciformes, sendo esse um dos eventos descritos na fisiopatologia da doença. (CAVALCANTE *et al*, 2015; ZAGO, PINTO, 2007; WARE *et al*, 2017; KATO *et al* 2009). No presente estudo observou-se que 20,4% dos pacientes com AF relataram a presença de dor frequente, ou seja 3 ou mais episódios de dores intensas e/ou graves por ano que exigiram cuidados, e 79,6% dos pacientes relataram dores não frequentes, ou seja, menos de 3 crises de dores por ano. Esses resultados estão de acordo com os descritos na literatura.

A associação entre deficiência de vitamina D e as manifestações clínicas dos indivíduos com AF pode trazer grandes benefícios para a melhoria ou o estadiamento da doença. Osunkwo e colaboradores (2012) sugerem que há um benefício potencial na suplementação de vitamina

D na redução do número de dias com dores. Em um estudo com pacientes pediátricos, Lee e colaboradores (2015) demonstraram que 74% dos pacientes que tiveram crises vaso-oclusivas frequentes apresentavam deficientes de vitamina D e que o aumento em 10 unidades de 25OHD estava associado com o decréscimo de 46% de desenvolver outra crise. Tal associação pode ter sido encontrada devido à alta prevalência de deficiência de vitamina D entre os pacientes, algo que não houve no presente estudo.

Os biomarcadores monitoram, detectam ou confirmam a presença de uma doença ou alguma condição médica específica e podem também serem utilizados para redefinir a classificação de alguma doença. (CALIFF, 2018). No presente estudo foram utilizadas as proteínas MCP-1 e KIM-1 como biomarcadores não convencionais de lesão renal. Sabe-se que os níveis urinários de algumas quimiocinas aumentam com o desenvolvimento de lesão renal. O MCP-1 tem sido avaliado como biomarcador para processos inflamatórios mononucleares que ocorrem após a IRA induzida por isquemia (SANTOS, 2014; PERES, 2013) e o KIM-1 como o biomarcador relacionado com lesão presente no túbulo renal proximal. (MAGRO, VATTIMO, 2007; IBRAHIM, 2021).

Em relação a análise dos resultados do biomarcador não convencional MCP-1 observa-se que houve diferença significativa entre os níveis urinários desse biomarcador em comparação com o grupo de indivíduos sem hemoglobinopatia. Esses resultados corroboram com os obtidos por Santos e colaboradores (2014) na qual se identifica o MCP-1 como biomarcador preditivo de lesão renal em pacientes com AF.

A análise da relação dos biomarcadores não convencionais KIM-1 e MCP-1 com a deficiência de vitamina D nos pacientes com AF evidenciou-se que houve uma associação entre os níveis séricos de vitamina D e os níveis urinários do biomarcador KIM-1, a qual pode se observar uma tendência de aumento nos níveis de KIM-1 nos pacientes com deficiência de vitamina D. Um aumento nos níveis de KIM-1 sugere o início de um dano em células do epitélio tubular proximal, considerada, assim, um sensível marcador de lesão tubular proximal (MAGRO; VATTIMO, 2007). Alguns estudos tem demonstrado um aumento nos níveis de KIM-1 e do MCP-1 em pacientes tanto adultos como pediátricos com AF (SUNDARAM *et al*, 2011; BECKER, 2011; SANTOS, 2015)

A realização da curva ROC teve como objetivo avaliar a especificidade e sensibilidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1. O cálculo da área sob a curva (AUC) é o resumo da curva ROC em um único valor, onde foram agregados todos os limiares da curva ROC. Sabe-se que

à medida que a AUC de um teste diagnóstico se aproxima de 1,00 (teste diagnóstico perfeito), maior será a sua capacidade discriminativa. (CERDA, CIFUENTES, 2011). Os resultados do presente estudo se mostraram estatisticamente significante, sendo que para o biomarcador KIM-1 a AUC ficou em 0,700 ($p < 0,05$) e para o biomarcador MCP1 a AUC ficou 0,764 ($p < 0,01$). Demonstrando, assim, que pacientes com anemia falciforme com baixos níveis séricos de vitamina D podem apresentar aproximadamente 70% de probabilidade de desenvolver doença renal

Portanto os achados da relação do dano renal com a deficiência de vitamina D sinalizam um envolvimento da vitamina D no dano renal. No entanto são necessários mais estudos de natureza prospectivos, com uma maior amostragem e com a dosagem da vitamina D sendo realizada por metodologia HPLC.

6. CONCLUSÃO

- Pacientes com AF apresentaram dosagens aumentadas dos biomarcadores convencionais proteinúria e albuminúria e dos biomarcadores não convencionais KIM-1 e MCP-1.
- Há uma associação entre os níveis séricos de vitamina D e os níveis urinários do biomarcador KIM-1, ou seja, há uma tendência de aumento nos níveis de KIM-1 nos pacientes com deficiência de vitamina D.
- Pacientes com AF e com baixos níveis séricos de vitamina D podem apresentar 70% de probabilidade de desenvolver doença renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAN, I.; BADDAM, S.; HILLIARD, L.M.; HOWARD, T.H.; FEIG, D.I.; LEBENSBURGER, J.D. Severe anemia early in life as a risk factor for sickle-cell kidney disease. **Blood**. 129(3):385–387, 2017

ADEGOKE, S.A.; BRAGA, J.A.P.; ADEKILE, A.D.; FIGUEIREDO, M.S. The Association of Serum 25-Hydroxyvitamin D with Biomarkers of Hemolysis in Pediatric Patients with Sickle Cell Disease. **J. Pediatr. Hematol. Oncol.** v. 40, n.2, p. 159 – 162, 2018.

ALJAMA, A.; ALKHALIFAH, M.; DABBOUS, I.A.; ALQUDAIHI, G. Vitamin D deficiency in sickle cell disease patients in Eastern Province of Saudi Arabia. **Ann. Saudi Med.** v. 38, n.2, p. 130 – 136, 2018.

ALVES, M.; BASTOS, M.; LEITÃO, F.; MARQUES, G. RIBEIRO, G.; CARRILHOA, F. Vitamina D – Importância da avaliação laboratorial. **Revista Portuguesa de Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo**, vol.8, jan-jul, pag. 32-39, 2013

ARAÚJO, P.C. O autocuidado na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol.29 no.3 São José do Rio Preto Julho/Setembro 2007

ATAGA, K.I.; DEREBAIL, V.K.; ARCHER, D.R. The glomerulopathy of sickle cell disease. **American Journal of Hematology.** vol.89. no.9, setembro, 2014

ATAGA, K.I.; ORRIGER, E.P. Renal abnormalities in sickle cell disease. **American Journal of Hematology.** 63:205-211, 2000

BALLAS, S.K. Sickle cell disease: Classification of clinical complications and approaches to preventive and therapeutic management. **Journal Clinical Hemorheology and Microcirculation**, vol.68, no 2-3, pp105-128, 2018

BANDEIRA, F.M.G.C; PERES, J.C.; CARVALHO, I.B.; ARAÚJO, A.S.; MELLO, M.R.B.; MACHADO, C. Hidroxiuréia em pacientes com síndromes falciformes acompanhados no Hospital Hemope, Recife, Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** vol. 26. no. 3 São José do Rio Preto, 2004

BARRETO, F.C.; STINGHEN, A.E.M.; Vitamina D e doença renal crônica: uma relação complicada. **Braz. J. Nephrol.** vol. 42 no.4 São Paulo out/dez 2020

BECKER AM (2011) Sickle cell nephropathy:Challenging the conventional wisdom. **Pediatr Nephrol** 26:2099–2011

BRASIL, Ministério da Saúde, **Doenças Falciformes Diretrizes Básicas de Cuidados**, 2015

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria nº. 27/2013, de 12/06/2013. **Relatório de recomendação nº. 57** da Comissão Nacional de Incorporação de Tecnologias em Saúde

BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme**, setembro 2017

BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme**, agosto 2016

BRASIL, Ministério da Saúde. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença Falciforme**, agosto 2012

BROWN, B.; LONG, K.; AGDERE, L.; KULPA, J.; ZARZOSO-FERNANDEZ, S.; CHOUDARY, D.; SUNDARUM, R.; The association between vitamin D deficiency and hospitalization outcomes in pediatric patients with sickle cell disease. **Blood Cells, Molecules and Diseases**. v. 82, 6pp, 2020.

CALIFF, R.M. Biomarkers definitions and their applications. **Sage Journals**, 6 de fevereiro de 2018

CANÇADO, R.D., JESUS, J.A. A doença Falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**; v.29, n.3, p. 203-206, 2007

CASTRO, L.C.G. O sistema endocrinológico da vitamina D. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** vol. 55 no. 8 São Paulo, novembro 2011

CAVALCANTE, J.E.A.; MACHADO, R.P.G.; LAURENTINO, M.R.; SANTOS, T.E.J.; BANDEIRA, I.C.J.; MAIA FILHO, P.A.; FIGUEIREDO, M.F.; MARTINS, A.M;C, LEMES, R.P.G. Clinical events and their relation to tumor necrosis fator-alpha and interleucin-10 genotypes in Sickle cell-Anemia patients. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, 9 14-19, 2016

CERDA, J.; CIFUENTES, L. Uso de curvas ROC em investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. **Rev Chil Infect**; 29 (2): 138-141, 2012

CHARACHE,S.; TERRIN, M.L.; MOORE, R.D.; DOVER GJ, Effect of hydroxyurea on the frequency of painful crises in sickle cell anemia. Investigators of the Multicenter Study of Hydroxyurea in Sickle Cell Anemia. **N Engl J Med**. 332 (20):1317-22, 1995

CRUZ, S.M.P. Avaliação da função renal em pacientes com anemia falciforme. **Escola Paulista de Medicina**, 2019

DARBARI, D.S.; ONYEKWEW, O.; NOURAIE, M.; MINNITI, C.P.; LUCHTAMAN-JONES, L.; RANA, S.; SABLE, C.; ENSING, G.; DHAM, N.; CAMPBELL, A.; ARTETA, MANUEL.; GLADWIN, M.T.; CASTRO, O.; TAYLOR, J.G.; KATO, G.J.; GORDEUK, V.; Markers of Severe Vaso-occlusive Painful Episode Frequency in Children and Adolescents with Sickle Cell Anemia – **The Journal of Pediatrics** . vol 160 February . pages 286-290, 2012

DINIZ, H.F.; ROMÃO, M.F.; ELIAS, R.M.; ROMÃO JÚNIOR, J.E.; Insuficiência e deficiência de vitamina D em pacientes portadores de doença renal crônica. **J. Bras. Nefrol.** vol 34. No. 1, São Paulo- Jan/março 2012

DI NUZZO, D.V.P; FONSECA, S.F. Anemia falciforme e infecção **J. Pediatr.** (Rio J.) vol.80 no.5 Porto Alegre 2004

GALIZA NETO, G.C; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares na anemia falciforme **J. Brasil. Patol. Med. Lab.** Rio de Janeiro, v. 39, n.1, p 51-56, 2003
2007

GUIBIS, B.; HABERMAN, D.; DURFOUR, D, CHRISTOPHE, C.; VERMYLEN, C.; KAGAMBAGE, F. Hydroxyurea for sickle cell disease in children and for prevention of cerebrovascular events: the Belgian experience. **Blood.** 105(7):2685-9; 2005

GUIMARÃES, S.P.; SOARES, J.B.B.; OLIVEIRA, V.C.; PARDINI, V.C.; FERREIRA, A.C.S. Mutações predisponentes à trombofilia em indivíduos de Minas Gerais – Brasil com suspeita clínica de trombose. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, São Paulo, v.31, n.1, p.19-24, 2009.

GOODMAN, B. M. *et al.* Prevalence of vitamin D deficiency in adults with sickle cell disease. **J. Natl. Med. Assoc.** v. 102, n. 4, p. 332 – 335, 2010.

HAMDI, M.; SALAMA, N.; MAHER, G. ELREFAEE, A. Vitamin D and nonskeletal complications among Egyptian sickle cell disease patients. **Advances in Hematology.** v. 2018, 7 pp, 2018.

HOLICK, M.F.; Vitamin D Deficiency- **The New England Journal of Medicine**, 2007

IANNONE, R.; OHENE, FREMPONG, K, FUCHS, E.J.; CASELLA, J.F.; CHEN, A, R.; Bone Marrow Transplantation for Sickle Cell Anemia: Progress and Prospects. **Pediatr Blood Cancer**, v. 44 , p 436 – 440 2005

IBRAHIM, M.Y.; O rim: função, células e biomarcadores. **Brazilian Journal of Nephrology** 2021

INDA FILHO, A.J e MELAMED, M.L. Vitamina D e Doença Renal- O que nós sabemos e o que nós não sabemos. **J. Bras. Nefrol.** 34(4): 323-331, 2013

JOHSON, C.; TELEN, M.J. Adhesion molecules and hidroxyurea in the pathophysiology of sickle cell disease. **Heamatologica** v. 93, n,4, p 481-486, 2008

JORGE, A.J.L.; CORDEIRO, J.R.; ROSA, M.L.G.; BIANCHI, D.B.C. Deficiência de vitamina D e doenças cardiovasculares. **Inst. Cardiovasc. Sci.** vol. 31 no. 4, Rio de Janeiro, julho/agosto 2018

KATO, G.J.; HEBBEL, R.P.; STEINBERG, M.H.; GLADWIN, M.T. Vasculopathy in sickle cell disease. *Biology Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and new Research Directions.* Am. **J. Hematol.** v.84 , n.9, p.618 - 625, 2009

LAURENTINO, M. R.; PARENTE FILHO, S.L.A.; PARENTE, L. L. C.; SILVA JÚNIOR, G.B.; DAHER, E.F.; LEMES, R.P.G. Non-invasive urinary biomarkers of renal function in sickle cell disease: an overview. **Annals of hematology**, v. 98, n. 12, *VAnn Hematol.* Disponível em:<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31641850/>>. Acesso em: 4/3/2021. 2019

LEE, M.T.; LICURSI, M.; MCMAHON, D. Vitamin D deficiency and acute vaso-occlusive complications in children with sickle cell disease. **Pediatr. Blood Cancer.** v. 62, p. 643 – 647, 2015.

LIMA, L.C.; OMENA, J.; LANZIANI, R.; CITELLI, M.; AVENASI, C.M. Fisiopatologia da doença renal crônica em adultos com doença. **Revista HUPE**, Rio de Janeiro, 14(3):58-63, 2015

MAGALHÃES. I.Q. Alterações Renais nas doenças falciformes. **Rev. Brasil. Hematologia. Hemoter.** São José do Rio Preto v. 29, n.3 2007

MAGRO, M.C.S.; VATTIMO, M.F.F.Avaliação da função renal: creatinina e outros biomarcadores, **Revista Brasileira de Terapia Intensiva** vol.19 n.2. São Paulo 2007

MANFREDINI, V; CASTRO, R;WAGNER, S.;BENFATO, M.S.; A fisiologia da anemia falciforme, Infarma, Brasília, n1/2 v 19 2007

NAOUM, PC E BONINI-DOMINGOS,C.R. Dificuldades no diagnóstico laboratorial das hemoglobinopatias **Rev. bras. hematol. hemoter.**;29(3):226-228 2007

ORLANDO, G.M.; NAOUM, PC.; SIQUEIRA, F.A.M. BONINI-DOMINGOS- C.R. Diagnóstico laboratorial de hemoglobinopatias em populações diferenciadas **Rev. Brasil. Hematol. Hemoter.** vol.22 no.2, 2000

OSUNKWO, I. HODGMAN, E.; CHERRY, K. Vitamin D deficiency and chronic pain in sickle cell disease. **British Journal of Haematology.** v. 153, p. 538-540, 2011.

PINHEIRO, L.S.; GONÇALVES, R.P.; TOMÉ, C.S.A.; ALCÂNTARA, A.E.; MARQUES, A.R.C.; SILVA, M.M. Prevalência de hemoglobina S em recém nascidos de Fortaleza: a importância da investigação neonat. **Rev. Bras. Ginecol.Obst**, v.28, n.2, p.122-125, 2006

PLATT, O.S. Hydroxyurea for the treatment of sickle cell anemia. **N Engl J Med.** 358(13):1362-9, 2008

PRETTO, L.A. Efetividade da hidroxiuréia em pacientes com anemia falciforme. Universidade de Mato Grosso, 2017

REES, D.C.; GIBSON, J.S. Biomarkers in sickle cell disease. **British Journal of Hematology**, v.156, p. 433-445, 2011

SPARKENBAUGH, E.; PAWLINKI, R. Interplay between coagulation and vascular inflammation in sickle cell disease. **British Journal of Haematology** Volume 162, Issue 1, pages 3–14, July 2013

SUNDARAM N, BENNETT M, WILHELM J, KIM MO, ATWEH G, DEVARAJAN P, MALIK P (2011) Biomarkers for early detection of sickle nephropathy. **Am J Hematol** 86:559–566

WARE, R. E.; MONTALEMBERT, M.; TSHILOLO, L.; ABBOUD, M.R. Sickle cell disease. *The Lancet*, v.390, p.311–323, janeiro 2017

WINTERS, A.C.; KETHMAN, W.; KRUSE-JARRES, R.; KANTER, J. DOSRDERS, J.N. Vitamin D insufficiency is a frequent finding in pediatric and adult patients with sickle cell disease and correlates with marker of cell turnover. **J. Nutr. Disorders Ther.** v. 4, n. 2, 5p. 2014.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.C.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética a insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Brasil. Hemat. Hemoter.** São José do Rio Preto v. 29, n.3 2007