



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**MARÍLIA ROCHA LAURENTINO**

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INOVADORES NO DIAGNÓSTICO  
PRECOCE DE LESÃO RENAL E ENDOTELIAL EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME EM USO OU NÃO DE HIDROXIURÉIA**

**FORTALEZA**

**2020**

MARÍLIA ROCHA LAURENTINO

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INOVADORES NO DIAGNÓSTICO  
PRECOCE DE LESÃO RENAL E ENDOTELIAL EM PACIENTES COM ANEMIA  
FALCIFORME EM USO OU NÃO DE HIDROXIURÉIA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

Coorientador: Dra. Elizabeth de Francesco Daher

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profa. Dra. Deysi Viviana Tenazoa Wong  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profa. Dra. Arlândia Cristina Lima Nobre de Moraes  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

FORTALEZA

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

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

---

- L413a Laurentino, Marília Rocha.  
AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES INOVADORES NO DIAGNÓSTICO PRECOCE DE LESÃO RENAL E ENDOTELIAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME EM USO OU NÃO DE HIDROXIURÉIA / Marília Rocha Laurentino. – 2020.  
58 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2020.  
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.  
Coorientação: Profa. Dra. Elizabeth de Francesco Daher.

1. Anemia falciforme. 2. Nefropatias. 3. Biomarcadores. 4. Hidroxiuréia. 5. Dano endotelial. I. Título.  
CDD 615

---

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais e à minha irmã por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Ao meu esposo Jônatas pela paciência, companheirismo, compreensão e conselhos.

À minha orientadora Profa. Dra. Romélia por todos os conhecimentos, conversas e conselhos durante todos esses anos de parceria.

Aos amigos do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas, pela excelente convivência e pela diversão proporcionada.

À Profa. Dra Elizabeth Daher, co-orientadora, pelo tempo disponibilizado e auxílio na elaboração deste trabalho.

Ao Gdayllon e Gabriela por terem me auxiliado nos experimentos e à Profa Alice, por disponibilizar seu laboratório para análise das amostras.

Aos professores participantes da banca examinadora Prof. Tiago, Profa. Arlândia e Profa Rosângela, Profa Deisy pelo tempo, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos funcionários do HEMOCE e ao Dr Osanildo pela disponibilidade e ajuda no ambulatório e nas coletas de sangue.

Aos pacientes com AF participantes do estudo, sem eles nada disso seria possível.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Não importa o que aconteça, continue a nadar” (Dory; Procurando Nemo, 2003)

## RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (HbSS). Apresenta uma elevada taxa de morbi-mortalidade devido à hemólise crônica, dano endotelial e episódios de vaso-oclusão, gerando danos a múltiplos órgãos. Alterações na função renal são frequentes na AF principalmente na fase adulta. Novos biomarcadores da função renal estão sendo estudados, com o propósito de detectar precocemente alterações renais em portadores de AF, como molécula de lesão renal 1 (KIM-1) e proteína quimiotática de monócitos (MCP-1). O objetivo do estudo foi avaliar os biomarcadores renais KIM-1 e MCP-1, associando-os com biomarcadores de hemólise e de dano endotelial. Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico em que participaram 92 pacientes com AF (62 em uso de hidroxiuréia e 25 sem uso) de ambos os sexos, atendidos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) e no Hemocentro (HEMOCE) em Fortaleza-Ceará e 34 indivíduos saudáveis como grupo controle. Os biomarcadores KIM-1, MCP-1, sindecano-1 e VCAM-1 foram mensurados através imunoensaio e as informações sobre os biomarcadores de hemólise (lactato desidrogenase (LDH), bilirrubina indireta (BI) e reticulócitos) e dados clínicos foram coletadas dos prontuários. Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico SPSS. O nível de significância foi estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). Pacientes com AF apresentaram um aumento de KIM-1, MCP-1, VCAM-1 e sindecano-1 em relação ao grupo controle. Pacientes sem uso de HU apresentaram um aumento significativo da pressão sistólica, contagem de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, LDH, BT, BD e albuminúria e uma diminuição da hemoglobina total em relação aos pacientes com AF que usavam HU. Pacientes com AF sem HU apresentaram uma associação de KIM-1 e MCP-1 com o aumento da contagem de reticulócitos. Sindecano-1 apresentou uma associação com o aumento dos biomarcadores de hemólise reticulócitos, BT e BD; e VCAM-1 uma associação com o aumento da BT. Por fim, o não uso de HU, a presença de anemia grave/moderada e o aumento da contagem de reticulócitos apresentaram uma influência nas concentrações de KIM-1 e MCP-1, apontando grupos de risco para o aumento desses biomarcadores e possível desenvolvimento de lesão renal. Podemos concluir que os pacientes com AF tem uma tendência de apresentarem lesão renal, estando associado à presença de anemia e hemólise, fatores que, juntamente com o não uso de HU, podem interferir na iniciação e progressão da nefropatia falciforme.

**Palavras-chave:** Anemia falciforme; Nefropatias; Biomarcadores; Hidroxiuréia; Dano endotelial

## ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is an inherited disease characterized by homozygous hemoglobin S (HbSS). It is characterized by the long mortality rate due to chronic, endothelial damage and vaso-occlusion episodes, generating multiple damages. Changes in renal function are frequent in SCA, especially in adulthood. New renal function biomarkers are being studied in order to detect early renal changes in patients with SCA, such as kidney injury molecule 1 (KIM-1) and monocyte chemotactic protein (MCP-1). The aim of this study was to evaluate the renal biomarkers KIM-1 and MCP-1, associating them with biomarkers of hemolysis and endothelial damage. This is a cross-sectional, analytical and analytical study involving 92 SCA patients (62 using hydroxyurea and 25 non-use) of both sexes, attended at the hematology outpatient clinic of the Walter Cantídio University Hospital (HUWC) and Hemocenter (HEMOCE) in Fortaleza-Ceará and 34 healthy cases as a control group. Biomarkers KIM-1, MCP-1, syndecano-1 and VCAM-1 were detected by immunoassay and as biomarkers of hemolysis and clinical data were collected from the medical records. The data were used using the statistical program GraphPad Prism. The level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). SCA patients without HU found an association of KIM-1 and MCP-1 with increased reticulocyte count. Syndecan-1 was associated with increased reticulocyte hemolysis, total bilirubin (TB) and direct bilirubin (DB) biomarkers; and VCAM-1 an association with increased TB. Finally, without the use of HU, a presence of severe anemia and an increase in the cross-linking count influence KIM-1 and MCP-1 alterations, the risk groups for the increase of these biomarkers and the possible development of renal lesions. We can conclude that patients with SCA have a tendency to have kidney damage, they are associated with the presence of anemia and hemolysis, factors that include non-HU use, can interfere in the initiation and progress of sickle cell nephropathy.

**Keywords:** Anemia, Sickle Cell; Kidney Diseases; Biomarkers; Hidroxyurea; Endothelial damage

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Mutação pontual na cadeia de  $\beta$ -globina na AF
- Figura 2 – Fisiopatologia da AF
- Figura 3 – Efeitos do tratamento com Hidroxiuréia
- Figura 4 – O modelo atual de nefropatia falciforme
- Figura 5 – ELISA sanduíche
- Figura 6 – KIM-1, MCP-1, VCAM-1 e Sindecano-1 em pacientes com AF e grupo controle.
- Figura 7 - Gráficos de dispersão em matriz, representando correlações significativas entre MCP-1 urinário, KIM-1 urinário e níveis de reticulócitos
- Figura 8 – Níveis de KIM-1 urinário de acordo com tercis dos níveis de reticulócitos para criação de um grupo de risco
- Figura 9 – Níveis de MCP-1 urinário de acordo com tercis dos níveis de reticulócitos para criação de grupo de risco
- Figura 10 – Níveis de Sindecano-1 sistêmico de acordo com tercis dos níveis de reticulócitos para criação de grupo de risco

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Características demográficas, clínicas e de complicações estudadas durante o acompanhamento de pacientes com AF.....	31
Tabela 2	- Avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o uso de HU.....	32
Tabela 3	- Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com parâmetros laboratoriais e clínicos alterados nos pacientes com AF.....	34
Tabela 4	- Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com parâmetros laboratoriais e clínicos alterados nos pacientes com AF que não faziam uso de HU.....	35
Tabela 5	- Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com a contagem de reticulócitos (estratificada por tercís) nos pacientes com AF que não faziam o uso de HU.....	37
Tabela 6	- Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com a contagem de reticulócitos nos pacientes com AF que não faziam o uso de HU.....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
AVC	Acidente vascular cerebral
BD	Bilirrubina direta
BI	Bilirrubina indireta
BT	Bilirrubina total
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DRC	Doença Renal Crônica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imun absorção enzimática
EROs	Espécies reativas de oxigênio
HbF	Hemoglobina Fetal
HbS	Hemoglobina S
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HU	Hidroxiuréia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IMC	Índice de Massa Corpórea
KIM-1	Molécula de lesão renal-1
LDH	Lactato Desidrogenase
LPDGH	Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
NFκB	Fator nuclear κB
NF	Nefropatia falciforme
NO	Óxido nítrico
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa

UFC	Universidade Federal do Ceará
VCAM-1	Molécula de adesão celular-vascular-1
VCM	Volume corpuscular médio

## LISTA DE SÍMBOLOS

$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gama
®	Marca Registrada
%	Porcentagem
mg	Miligramma
dL	Decilitro
fL	Fentolitro
g	Gramma
$\kappa$	Kappa
$\mu$ L	Microlitro
mmHg	Milímetros de mercúrio
~	Aproximadamente
<	Menor que
$\geq$	Maior ou igual que
nm	Nanômetro
kg	Kilogramma
m <sup>2</sup>	Metro quadrado
L	Litro

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Anemia Falciforme</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Mecanismos fisiopatológicos</b> .....	15
<b>1.3</b>	<b>Manifestações clínicas da AF</b> .....	17
<b>1.4</b>	<b>Moduladores clínicos da AF</b> .....	18
<b>1.5</b>	<b>Tratamento da AF</b> .....	18
<b>1.6</b>	<b>Comprometimento renal na AF</b> .....	20
<b>1.7</b>	<b>Biomarcadores de dano renal</b> .....	24
<i>1.7.1</i>	<i>KIM-1</i> .....	24
<i>1.7.2</i>	<i>MCP-1</i> .....	24
<i>1.7.3</i>	<i>Sindecano-1</i> .....	25
<i>1.7.4</i>	<i>VCAM-1</i> .....	26
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	27
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	27
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	28
<b>3.1</b>	<b>Considerações éticas</b> .....	28
<b>3.2</b>	<b>Desenho do estudo</b> .....	28
<b>3.3</b>	<b>Local do estudo</b> .....	28
<b>3.4</b>	<b>Casuística</b> .....	28
<b>3.5</b>	<b>Seleção da amostra</b> .....	28
<i>3.5.1</i>	<i>Critérios de inclusão</i> .....	28
<i>3.5.2</i>	<i>Critérios de exclusão</i> .....	29
<b>3.6</b>	<b>Coleta dos dados e amostras</b> .....	29
<b>3.7</b>	<b>Avaliação laboratorial</b> .....	29
<i>3.7.1</i>	<i>Avaliação da função renal</i> .....	29
<i>3.7.2</i>	<i>Análise de KIM-1 e MCP-1</i> .....	30
<i>3.7.3</i>	<i>Análise de VCM-1 e Sindecano-1</i> .....	31
<b>3.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	32

4.1	<i>Parâmetros gerais de pacientes com AF e o uso de HU</i> .....	32
4.2	<i>Biomarcadores e os parâmetros laboratoriais relacionados ao não uso de HU</i> .....	34
4.3	<i>Complicações renais, clínicas e vasculares de acordo com os níveis de reticulócitos</i> .....	37
4.4	<i>Influência dos reticulócitos juntamente com o uso de HU e anemia grave/moderada nos níveis dos biomarcadores renais estudados</i> .....	40
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	42
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	48
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	49
	<b>ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b> .....	55
	<b>ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS</b> .....	56
	<b>APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO</b> .....	58

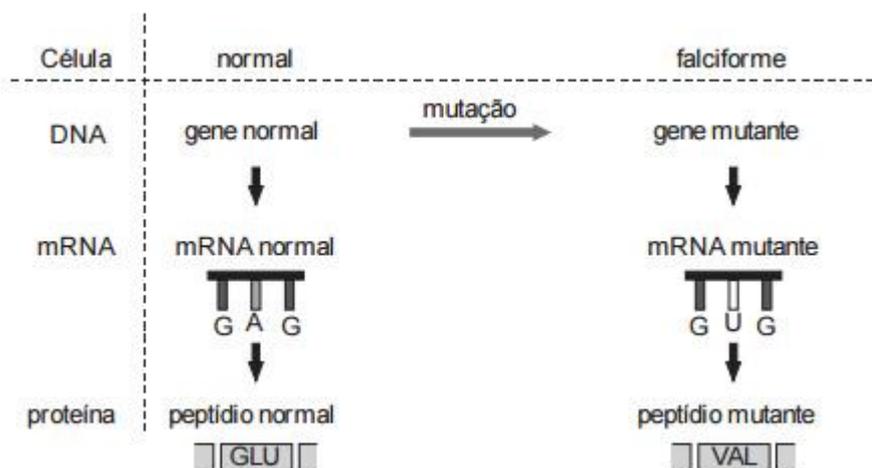
# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Anemia Falciforme

A Anemia falciforme (AF) é uma doença hematológica autossômica recessiva que afeta milhões de indivíduos no mundo. Segundo estudo realizado, a morte por AF aumentou 42% de 1990 a 2013, chegando a mais de 100 mil óbitos por ano (REDDY, 2016). No Brasil, estima-se que 25 mil a 50 mil pessoas tenham a doença (HbSS) e que 4% da população brasileira possua o traço falciforme (heterozigotos) (SAÚDE, 2018). Em 2016, foram diagnosticados 1.071 casos novos da doença através do Programa Nacional de Triagem Neonatal (SAÚDE, 2012). A incidência de AF é de aproximadamente 1-3 /1000 nascidos vivos e em estados como a Bahia, onde a ascendência africana predomina, essa taxa chega a 1/650 recém-nascidos (SAÚDE, 2012; ARDUINI *et al.*, 2017).

A doença foi primeiramente descrita em 1910 por Herrick e caracteriza-se por uma mutação pontual no cromossomo 11, posição 6 da extremidade N-terminal da cadeia  $\beta$  da globina. Essa mutação ocasiona uma simples troca do nucleotídeo adenina por timina, levando à substituição de um resíduo de ácido glutâmico hidrofílico por um resíduo de valina hidrofóbico na sexta posição na cadeia de  $\beta$ -globina, resultando em um tetrâmero de hemoglobina S (HbS) mutado (Figura 1). A presença de AF ocorre quando há HbS em homozigose (SERJEANT, 2010; NOVELLI; GLADWIN, 2018).

**Figura 1** - Mutação pontual na cadeia de  $\beta$ -globina na AF



Nota: Mutação pontual que substitui uma adenina por uma timina, levando à tradução do aminoácido valina ao invés do ácido glutâmico na cadeia  $\beta$  da globina ocasionando a formação da HbS mutada. Fonte: <http://experimentoteca.com/biologia/perguntas/banco-de-questoes-genetica-hemoglobina-e-anemia-falciforme-2/>

## 1.2 Mecanismos Fisiopatológicos

A AF apresenta quatro processos principais envolvidos na fisiopatologia da doença: polimerização da HbS, vaso-oclusão, hemólise mediada pela disfunção endotelial e inflamação (NOVELLI; GLADWIN, 2018).

A troca do aminoácido ácido glutâmico por valina favorece a polimerização da HbS sob baixas taxas de oxigênio. Nesse estado, a molécula de HbS torna-se alongada e as globinas beta S ficam mais próximas. Essa mudança de conformação favorece o contato entre as regiões da desoxiemoglobina, o que não é possível no estado oxigenado. Por meio da união de vários tetrâmeros de HbS, formam-se moléculas agregadas que se organizam em longos polímeros de filamentos duplos, que por sua vez se associam em feixes. Esses feixes de “cristais” dentro das hemácias determinam alterações na célula, causando menor deformabilidade, rigidez celular, estresse energético, desidratação, reologia prejudicada e hemólise prematura, e distorcem a membrana do eritrócito, dando à célula uma forma alongada conhecida por “hemácia em foice” ou “falcizada” (MANFREDINI *et al.*, 2007; ZAGO; PINTO, 2007; NOVELLI; GLADWIN, 2018).

A formação de polímeros de HbS dentro das hemácias ocasiona alterações como o efluxo de potássio, o aumento do cálcio intracelular e da membrana, a formação de polímeros da hemoglobina com proteínas da membrana, como a banda 3, a exposição da fosfatidil-serina e CD36. Essas modificações podem amplificar e ocasionar o aumento da adesão de hemácias ao endotélio, que influenciam na migração de leucócitos e plaquetas e fenômenos inflamatórios; enrijecimento da membrana da hemácia, encurtando sua sobrevivência em circulação; depleção de óxido nítrico (NO), que contribui para vasoconstrição e ativação da inflamação e coagulação (ADEKILE, 2013; MANFREDINI *et al.*, 2007; ZAGO; PINTO, 2007).

Além da taxa de oxigenação, outros fatores incluindo pH, temperatura e os níveis de 2,3-difosfoglicerato, influenciam na falcização da hemácia, sendo a taxa de polimerização proporcional à concentração intracelular de HbS e inversamente proporcional à concentração de hemoglobina fetal (HbF), sendo este último um dos principais parâmetros influenciadores na clínica da AF. Portanto, elevadas taxas de HbS, baixas tensões de oxigênio e um retardo na circulação, como o que ocorre em órgãos como o baço e rins, tornam o ambiente favorável à polimerização da HbS e falcização da hemácia (ADEKILE, 2013; NOVELLI; GLADWIN, 2018)

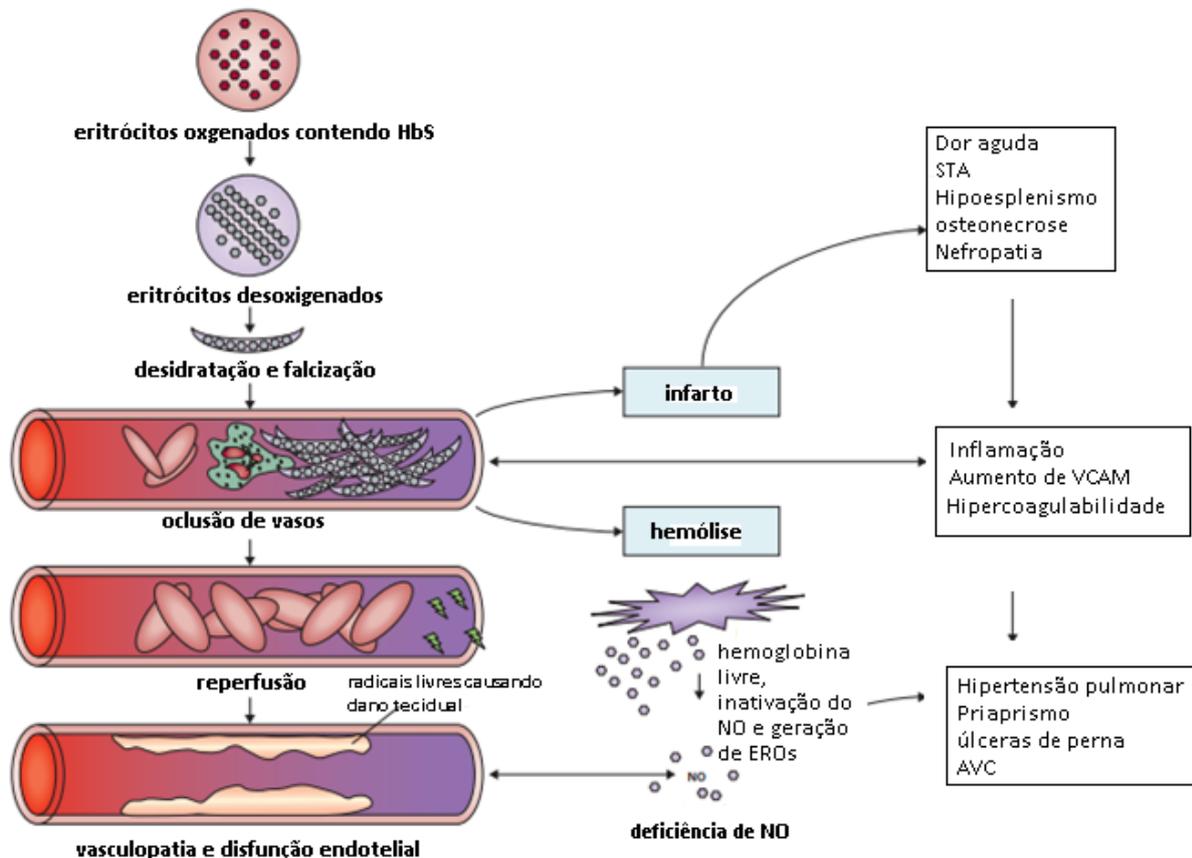
As hemácias falciformes apresentam-se de forma rígida devido à polimerização da HbS e à desidratação, e por isso, possuem maior propensão a ficarem aprisionadas no interior

da microcirculação. Somando-se a isso, o aumento da viscosidade plasmática contribui para o comprometimento do fluxo sanguíneo, resultando em vaso-oclusão episódica e sustentada. Além disso, as hemácias falcizadas estão sujeitas à hemólise, causando a anemia crônica (ZAGO; PINTO, 2007; ADEKILE, 2013).

A hemoglobina plasmática liberada pelos eritrócitos falciformes hemolisados intravascularmente consome NO, produzindo metemoglobina e nitrato bio-inativo. O NO é produzido pelo endotélio e é um regulador crítico de função vascular, regulando o tônus vasodilatador basal, inibindo a ativação plaquetária e a expressão transcricional de moléculas de adesão, como a VCAM-1. A hemoglobina, heme e ferro catalisam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), limitando ainda mais a biodisponibilidade do NO e ativando o endotélio. Os eritrócitos lisados também liberam a arginase que consome a L-arginina, substrato para a produção de NO, culminando na deficiência de NO endotelial. A depleção crônica de NO pode contribuir para vasoconstrição, vasculopatia proliferativa, hipertensão pulmonar, ativação de moléculas de adesão endotelial como VCAM-1, ativação de plaquetas e produção de endotelina-1, que além de ação vasoconstritora, esse peptídeo aumenta as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 solúveis e também estimula monócitos a secretarem citocinas inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e substâncias que aumentam a produção de superóxidos pelos neutrófilos.. O equilíbrio normal da vasoconstrição à vasodilatação é, portanto, desviado para vasoconstrição, ativação endotelial e proliferação de células (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; ZAGO; PINTO, 2007; KATO *et al.*, 2009).

A AF é caracterizada , portanto, por uma diminuição da disponibilidade do NO, favorecendo a oclusão vascular, que juntamente com a hemólise e consequente ativação do endotélio vascular, induzem respostas inflamatórias contínuas na AF, que se manifestam por aumento de moléculas de adesão, migração de leucócitos e plaquetas, citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. O impacto crônico da anemia hemolítica sustentada e eventos vaso-oclusivos episódicos resultam no desenvolvimento progressivo de complicações a órgãos vitais (Figura 2) (REES; GIBSON, 2012; DAMANHOURI *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2015).

**Figura 2 – Fisiopatologia da AF**



Nota: A desoxigenação faz com que a HbS se polimerize levando a hemácia à forma de “foice”. A vaso-oclusão resulta da interação de eritrócitos falciformes com leucócitos e o endotélio vascular. A oclusão vascular então leva ao infarto, hemólise e inflamação; a inflamação aumenta a expressão das moléculas de adesão, aumentando ainda mais a tendência dos eritrócitos falciformes em aderir ao endotélio vascular e piorar a vaso-oclusão. Reperusão do tecido isquêmico gera radicais livres e dano oxidativo. Os eritrócitos danificados liberam hemoglobina livre no plasma, causando deficiência funcional do NO e contribuindo para o desenvolvimento da vasculopatia. Fonte: REES; GIBSON, 2012 (adaptado)

### 1.3 Manifestações clínicas da AF

As manifestações clínicas dos pacientes com AF são heterogêneas e de causas multifatoriais, mas em geral apresentam relação com os dois principais eventos da doença: a hemólise e a vaso-oclusão (KATO *et al.*, 2009).

NA AF a hemólise crônica causa desequilíbrio vascular, com diminuição da meia-vida das hemácias, refletindo na concentração de hemoglobina (anemia crônica), contagem de reticulócitos, alterações nos níveis de bilirrubinas e LDH e, devido a isso, esses parâmetros tem sido estudados como forma de avaliar e monitorar a evolução da doença, sendo utilizados na prática clínica (NOLAN *et al.*, 2005; CERQUEIRA *et al.*, 2011; MOREIRA *et al.*, 2015).

Além disso, a hemólise está associada à eventos como o aparecimento de priapismo, hipertensão pulmonar, úlceras de perna e acidente vascular cerebral (AVC). A dor

no paciente falciforme pode ser um sintoma agudo ou crônico. No quadro agudo, a dor está associada à isquemia tecidual aguda causada pela vaso-oclusão, estando relacionado a subfenótipos como osteonecrose e síndrome torácica aguda (STA) (KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; KATO *et al.*, 2009).

A evolução da AF é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas, que atingem a maioria dos órgãos e que comprometem consideravelmente a qualidade de vida do paciente, dentre elas podem ser citadas a retinopatia, necrose óssea (especialmente da cabeça do fêmur), cálculos de vesícula, infecções recorrentes e insuficiência renal (ZAGO; PINTO, 2007).

#### **1.4 Moduladores clínicos da AF**

Apesar de todos os pacientes com AF apresentarem a mesma mutação genética no gene da  $\beta$ -globina, clinicamente podemos observar uma grande diferença entre eles. A concentração de HbF é um importante contribuinte genético para essa variabilidade. Esta hemoglobina é predominantemente produzida durante a vida fetal, estando presente em concentrações muito baixas (~ 1%) em adultos, e está amplamente restrita a uma pequena população de glóbulos vermelhos (chamadas células F). A concentração de HbF varia entre os indivíduos e é hereditária como um traço quantitativo. Elevadas concentrações de HbF reduzem a tendência da HbS de polimerizar, pois diluem a hemoglobina mutada circulante, reduzindo a gravidade da AF (STEINBERG, 2009; ORKIN; HIGGS, 2010).

Além da concentração de HbF, outros fatores genéticos como a associação com a  $\alpha$ -talassemia e os haplótipos da  $\beta$  globina também podem modular o curso clínico da doença. Vários polimorfismos de nucleotídeo único em loci gênicos, tanto dentro do *cluster* do gene da  $\beta$ -globina no cromossomo 11 como em outros cromossomos, estão sendo cada vez mais identificados, assim como mecanismos epigenéticos e ambientais que também podem interferir na heterogeneidade clínica da doença (STEINBERG, 2009; ADEKILE, 2013).

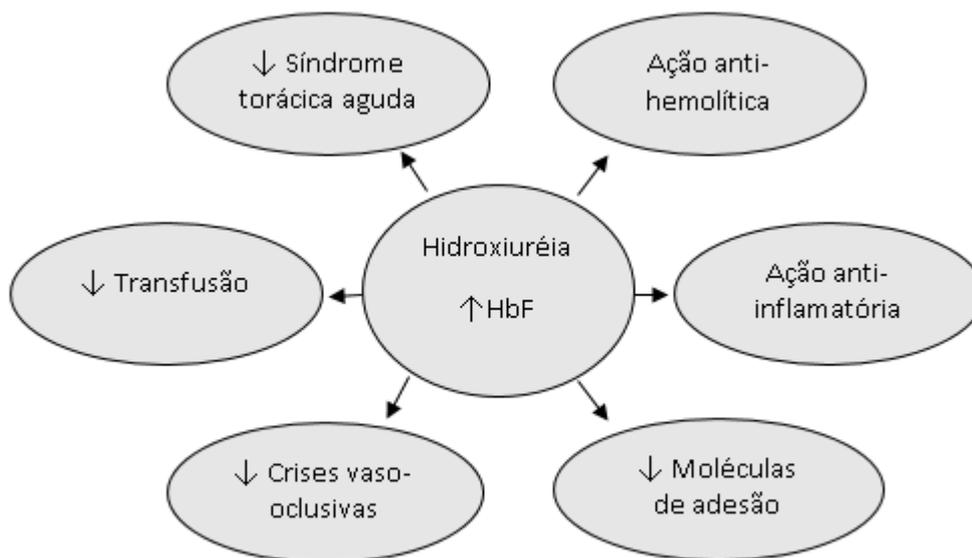
#### **1.5 Tratamento da AF**

Apesar dos recentes avanços na compreensão da AF, as opções terapêuticas para a doença ainda permanecem limitadas. O manejo dos pacientes ainda é de suporte, incluindo terapias sintomáticas (antibióticos, antiinflamatórios) e consistindo principalmente no controle da dor (analgésicos). Para aqueles pacientes que tem/tiveram AVC, dor crônica intratável, ou

sequestro esplênico repetido, a indicação é a transfusão sanguínea de forma regular. O padrão de tratamento também inclui a terapia medicamentosa com administração oral de hidroxiuréia (HU) e transplante de células-tronco hematopoéticas que é o único tratamento curativo, mas que requer um doador histocompatível e apresenta complicações como a doença do enxerto *versus* hospedeiro. Estudos envolvendo terapia gênica estão sendo realizados como forma de se obter um tratamento definitivo com as células-tronco do próprio paciente e sem os riscos envolvidos no transplante (IANNONE *et al.*, 2005; KOHNE, 2011; ORKIN; BAUER, 2018).

A HU é um potente inibidor da ribonucleotideo redutase e atualmente é o principal fármaco usado para tratar de forma eficaz os pacientes com AF. A HU melhora o curso clínico do pacientes, aumentando progressivamente os níveis de HbF e, portanto, reduzindo a concentração de HbS, diminuindo seus efeitos deletérios. Além disso, estudos também demonstraram que a droga apresentou capacidade de reduzir a adesão de eritrócitos ao endotélio, limitar a ativação endotelial, diminuir a contagem de leucócitos e plaquetas, atuar como um doador de NO, reduzir a hemólise e apresentar eficácia clínica comprovada para prevenir eventos vaso-oclusivos agudos (Figura 3) (NAHAVANDIM *et al.*, 2002; AGRAWAL *et al.*, 2014; NADER *et al.*, 2018).

Na doença renal, o aumento da HbF apresentou associação com a menor incidência de microalbuminúria e melhora da hipostenúria, enquanto que o tratamento com HU apresentou associação com redução da hiperfiltração e microalbuminúria. Pacientes recebendo HU tiveram um declínio na ocorrência de albuminúria em comparação com aqueles que não recebiam qualquer tratamento. Apesar do mecanismo de albuminúria reduzida permanecer incerto, tem-se sugerido que por a HU diminuir a hemólise e falcização das hemácias, isso levaria à diminuição da lesão renal isquêmica. Um outro estudo relata redução da proteinúria em pacientes pediátricos em terapia com HU, entretanto o uso desse medicamento na prevenção do desenvolvimento ou progressão de nefropatia ainda necessita de estudos mais aprofundados (MCKIE *et al.*, 2007; MILLER *et al.*, 2010; AYGUN *et al.*, 2013; LAURIN *et al.*, 2014; ABAN *et al.*, 2017; HARIRI *et al.*, 2018).

**Figura 3** - Efeitos do tratamento com Hidroxiuréia

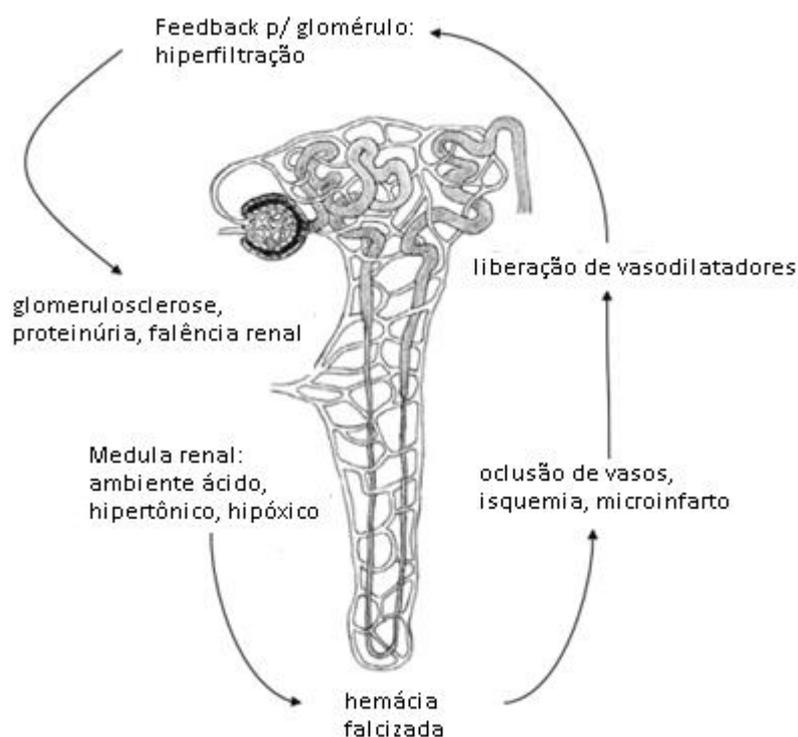
### 1.6 Comprometimento renal na AF

O rim pode ser afetado de diferentes formas na AF e isso geralmente se inicia na infância e progride para a idade adulta. O envolvimento renal, chamado nefropatia falciforme (NF), inclui várias manifestações renais, como defeito de acidificação, disfunção do néfron distal, necrose papilar renal e proteinúria relacionada à lesão glomerular, levando à doença renal terminal (MAIGNE *et al.*, 2010).

O ambiente ácido, hipóxico da medula renal e sua hiperosmolalidade desidrata os eritrócitos, aumentando assim a concentração intracelular de HbS e promovendo a falcização no interior da *vasa recta* descendente. Além disso, o fluxo sanguíneo relativamente lento na *vasa recta* prolonga o trânsito de hemácias através da medula, aumentando assim a propensão à polimerização da HbS. Finalmente, o fluxo sanguíneo lento promove a adesão de eritrócitos ao endotélio, que juntamente com a falcização, resultam na oclusão dos vasos sanguíneos com comprometimento do fluxo, ocasionando infarto das células tubulares e hipóxia, lesão endotelial, isquemia de reperfusão, estresse oxidativo e inflamação, com liberação de substâncias vasodilatadoras, como prostaglandinas e NO, que retornam ao glomérulo causando um aumento na taxa de filtração glomerular (TFG). A hiperfiltração prolongada resulta em dano renal e no desenvolvimento de proteinúria, estando também associada à hemólise crônica (Figura 4). A hiperfiltração e proteinúria causam glomerulosclerose e redução da função renal

e, eventualmente, o desenvolvimento da doença renal crônica (HAYMANN *et al.*, 2010; BECKER, 2011; DA SILVA; LIBÓRIO; DAHER, 2011; NATH; HEBBEL, 2015).

**Figura 4** - O modelo atual de nefropatia falciforme.



Nota: O ambiente da medula renal é hipertônico, hipóxico e ácido, causando reversível falcização dos eritrócitos. A célula em “foice” ocasiona oclusão de vasos, isquemia e microinfarto da *vasa recta*. A destruição desencadeia a liberação de substâncias vasodilatadoras (como prostaglandinas e óxido nítrico) que retornam ao glomérulo causando hiperfiltração. Com o tempo, a lesão por hiperfiltração leva à glomerulosclerose, proteinúria e eventual insuficiência renal. Fonte: BECKER, 2011 (adaptado).

Estudos mostram uma associação da hemólise crônica e da anemia com a lesão renal na AF. A HbS é uma proteína instável que sofre auto-oxidação e desnaturação produzindo espécies oxidantes e grupamento heme livre. A passagem de HbS através de podócitos e células epiteliais tubulares pode ocasionar lesão celular mediada por oxidantes. Adicionalmente, o heme é um ligante para o receptor do Toll-like tipo 4, que está presente nas células epiteliais endoteliais, mesangiais e tubulares, e nos podócitos, desencadeando respostas pró-inflamatórias nestas células. Os efeitos pró-oxidantes da HbS e do heme podem regular positivamente os genes pró-inflamatórios e fibrogênicos, levando a processos infiltrativos e fibrosantes nos compartimentos glomerular e tubulointersticial (HAYMANN *et al.*, 2010; NATH; HEBBEL, 2015).

A destruição da medula renal começa na infância e é responsável pelo defeito de concentração urinária observado em muitos pacientes com AF. A incapacidade de concentrar ao máximo a urina (hipostenúria) é a primeira manifestação do envolvimento renal na AF. Este defeito de concentração urinária começa em idade precoce e leva à poliúria e perda de água livre, que quando não compensada com ingestão de líquidos, pode levar ao aumento da osmolaridade sanguínea. Indivíduos com maiores valores de HbF foram capazes de concentrar melhor sua urina, apoiando a teoria de que é a polimerização da hemoglobina (reduzida pela HbF) a causa da destruição da medula renal (TSARAS *et al.*, 2009; MILLER *et al.*, 2010; BECKER, 2011; NATH; HEBBEL, 2015).

A presença de proteínas na urina (proteinúria) na AF está relacionada com a idade e começa como microalbuminúria e progride para proteinúria evidente (macroalbuminúria) à medida que o rim sofre mais danos. Cerca de 20 a 35% dos pacientes apresentam microalbuminúria na adolescência, aumentando para 60% a taxa de adultos que progridem para macroalbuminúria (ABAN *et al.*, 2017).

A albuminúria é atualmente considerada um biomarcador relevante para detectar dano glomerular em pacientes com AF pois, associada ou não à hiperfiltração, é o sintoma renal mais precoce que reflete a lesão glomerular em pacientes adultos e juvenis com AF. A proteinúria está associada a uma série de fatores como o aumento da pressão arterial, baixos níveis de hemoglobina, hemólise, leucocitose, hematúria, crise vaso-oclusiva prévia, haplótipo do gene  $\beta S$ , hipertensão pulmonar, AVC e STA (HAYMANN *et al.*, 2010; NATH; HEBBEL, 2015; BARTOLUCCI *et al.*, 2016; ABAN *et al.*, 2017).

Após o desenvolvimento da proteinúria, alguns pacientes com AF progridem para doença renal crônica (DRC) com diminuição da TFG devido a interações entre múltiplos processos nos compartimentos vascular, glomerular, tubular e intersticial do rim. A DRC pode ser causada por vários danos agudos, porém leves, ou um único dano agudo ao rim. Este conceito é especialmente aplicável na NF, já que a mesma é caracterizada por episódios intermitentes de vaso-oclusão, e o rim na AF mostra uma suscetibilidade aumentada a um único insulto agudo. No estudo de Powars e colaboradores (1991) a insuficiência renal em pacientes com AF foi precedida por anemia grave/moderada, proteinúria, síndrome nefrótica, hipertensão e hematúria microscópica além de apresentarem três vezes mais chance de desenvolver doença pulmonar restritiva crônica, úlceras de perna e AVC do que pacientes sem falência renal (POWARS *et al.*, 1991; BECKER, 2011; NATH; HEBBEL, 2015).

A hematúria está entre as manifestações renais mais comuns da AF, afetando 13 a 30% dos pacientes. A maioria é assintomática, podendo os pacientes ocasionalmente relatarem

dor nas costas ou dor abdominal. A maior prevalência está associada ao aumento da idade e ao sexo masculino. A hematúria pode ser microscópica ou macroscópica e ocorre devido a congestão capilar, especialmente nos vasos medulares, com o extravasamento de hemácias para o lúmen tubular, além de também poder refletir a presença de necrose papilar renal causada por vaso-oclusão na *vasa recta*, o que pode contribuir para o desenvolvimento de DRC (NATH; HEBBEL, 2015; HARIRI *et al.*, 2018; LE JONCOUR *et al.*, 2018).

Apesar de comum, nem todos os pacientes com AF desenvolverão proteinúria e nem todos os pacientes com proteinúria desenvolverão DRC, e não está claro quais fatores predizem ou promovem a progressão em pacientes suscetíveis. Anormalidades na pressão arterial e a presença de doenças associadas, são fatores conhecidos por contribuir para a progressão de todos os tipos de doença renal. Além disso, influências genéticas também podem contribuir para o desenvolvimento de doença renal na AF. O envolvimento do sistema renina-angiotensina intrarrenal também vem sendo estudado como um dos principais contribuintes para a fisiopatologia da NF (BECKER, 2011; SUNDARAM *et al.*, 2011).

Os biomarcadores clássicos de dano renal, como os níveis plasmáticos de creatinina, não são muito informativos na AF, visto que, devido à hiperfiltração, os pacientes apresentam uma TFG superior à normal e alta depuração da creatinina urinária, apresentando níveis séricos deste marcador reduzidos. Portanto, as complicações renais dificilmente são identificáveis nos estágios iniciais, pois a creatinina sérica aumenta apenas nos estágios finais da NF. A TFG subnormal e os níveis elevados de creatinina sérica desenvolvem-se apenas quando há proteinúria significativa. Além disso, a TFG estimada a partir do clearance de creatinina ou dos níveis de creatinina sérica é repleta de erros devido à alta excreção de creatinina na AF, variando a massa muscular e o estado de hidratação (DA SILVA; LIBÓRIO; DAHER, 2011; SUNDARAM *et al.*, 2011; HARIRI *et al.*, 2018).

Há evidências de que uma maior acurácia diagnóstica da disfunção renal pode ser alcançada pela combinação de mais de um biomarcador, devido a isso, novos biomarcadores são necessários para o diagnóstico precoce da NF antes que o dano ao rim se torne extenso e irreversível, de modo que as intervenções terapêuticas sejam eficazes na prevenção da progressão do dano renal (SUNDARAM *et al.*, 2011; HARIRI *et al.*, 2018).

## 1.7 Biomarcadores de dano renal

### 1.7.1 KIM-1

A molécula de injúria renal 1 (KIM-1) é uma proteína transmembrana tubular proximal que é especificamente expressa em células tubulares proximais lesadas, estando associado à lesão do túbulo proximal e à doença renal aguda e crônica. Sua concentração regula-se positivamente em células do túbulo proximal desdiferenciadas após lesão isquêmica ou nefrotóxica. Vários estudos sobre lesão renal aguda indicaram a utilidade desse marcador na previsão de resultados adversos, no entanto, sua utilidade na doença renal crônica ainda está sendo debatida. No estudo de Sundaram e colaboradores (2011) KIM-1 apresentou uma forte associação com o aumento da albuminúria em pacientes com AF, mostrando-se um biomarcador promissor de NF (DA SILVA; LIBÓRIO; DAHER, 2011; DEVARAJAN, 2011; SUNDARAM *et al.*, 2011; HAMIDEH *et al.*, 2014).

Embora o gene KIM-1, ou a expressão da proteína seja indetectável no rim normal, após uma injúria no tecido, mRNA- KIM-1 e sua proteína são rapidamente sintetizados e localizadas em níveis muito elevados na membrana apical do túbulo proximal, sendo encontrada nos três seguimentos do túbulo. Uma forma solúvel de KIM-1 humana pode ser detectada na urina de pacientes com necrose tubular aguda e pode servir como um biomarcador útil no dano tubular proximal do rim, facilitando o diagnóstico precoce e servindo como um diagnóstico diferencial de lesão renal (VAIDYA; FERGUSON; BONVENTRE, 2008; PERES *et al.*, 2013).

Características como a falta de expressão de KIM-1 nos rins normais, sua expressão aumentada e inserção na membrana apical do túbulo proximal e sua persistência na célula epitelial até a recuperação total da célula fazem dessa proteína um importante biomarcador de dano renal .

### 1.7.2 MCP-1

A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) tem sido relatada como uma quimiocina potente produzida por células renais, sendo um biomarcador para processos inflamatórios mononucleares que ocorrem após lesão renal aguda induzida por isquemia. MCP-1 é considerada a quimiocina mais potente para o recrutamento de monócitos/macrófagos, sendo expressa principalmente por células epiteliais glomerulares e tubulares durante a

inflamação renal (PERES *et al.*, 2013). Em camundongos, a inibição do MCP-1 reduziu significativamente a infiltração renal por células inflamatórias e a progressão da nefrite lúpica.

O MCP-1 tem um papel crucial na inflamação e na resposta imune, e sua ligação ao receptor CCR2 inicia uma série de vias de sinalização que regulam a ativação e a migração quimiotática das células-alvo. O MCP-1 promove alterações inflamatórias nos níveis celular, plasmático e tecidual, levando à sugestão de que a inibição do eixo MCP-1/CCR2 possa ser um possível alvo terapêutico farmacológico (DESHMANE *et al.*, 2009; BIANCONI *et al.*, 2017).

Em pacientes com AF, MCP-1 apresentou níveis elevados em comparação ao grupo controle e o uso da HU apresentou uma associação com a diminuição deste biomarcador. MCP-1 esteve também associado com a albuminúria (DOS SANTOS *et al.*, 2015).

### **1.7.3 Sindecano-1**

A ativação e a disfunção endotelial desempenham um papel central na fisiopatologia da AF, estando relacionada à vaso-oclusão. O endotélio é protegido contra células e proteínas sanguíneas circulantes pelo glicocálice, uma estrutura de carboidratos (proteoglicanos e glicoproteínas) de aproximadamente 1 µm de espessura que tem propriedades anti-adesivas e anticoagulantes, protegendo o endotélio e mantendo a função da barreira vascular. A lesão desta estrutura mostrou aumentar a permeabilidade capilar, levando à adesão de leucócitos e plaquetas, edema tecidual e inflamação acentuada, com aumento da expressão de moléculas de adesão, ocasionando um estado procoagulante (ALPHONSUS; RODSETH, 2014; CAVALCANTE *et al.*, 2016)

O volume do glicocálice pode ser regulado por diversos fatores e sua degradação pode ocorrer durante condições de isquemia, inflamação e hipóxia, que ocorrem continuamente na AF. A redução do volume do glicocálice pode facilitar as interações do endotélio ativado com as células sanguíneas e proteínas, apresentando um papel importante na ativação endotelial e na fisiopatologia da oclusão vascular na AF (VAN BEERS, E. J. *et al.*, 2008; MENESES *et al.*, 2015).

O Sindecano-1 é uma proteína transmembrana, sendo um dos principais componentes do glicocálice endotelial. A liberação de sindecano do glicocálice é estimulada *in vitro* por fatores pró- inflamatórios e ativada *in vivo* sob condições inflamatórias. Quando medido no plasma sanguíneo, é um biomarcador de dano de glicocálice endotelial, apresentando-se aumentado em pacientes com doença renal crônica (BRAZ, 2014; CAVALCANTE *et al.*, 2016).

#### **1.7.4 VCAM-1**

A proteína 1 de adesão celular vascular (VCAM-1) é uma glicoproteína transmembrana que tem importante participação na migração de células inflamatórias, nas funções efetoras de leucócitos e na adesão de células apresentadoras de antígenos. Lesões ao endotélio renal aumentam a expressão de diferentes moléculas de adesão, como a de VCAM-1, promovendo interações leucócito-endotélio. VCAM-1, portanto, pode ser utilizado como um marcador de ativação celular endotelial na injúria renal (KELLY *et al.*, 1994, 1996; CAVALCANTE *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a identificação de biomarcadores de lesão renal precoce não invasivos, e sua inserção na prática clínica, associada à outros parâmetros envolvidos na fisiopatologia e no prognóstico da AF, contribuirão para identificar mecanismos envolvidos no desenvolvimento das síndromes renais nesses pacientes, facilitando o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na prevenção, monitoramento e no tratamento da nefropatia na AF.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Estudar a associação e correlação de biomarcadores inovadores de lesão renal precoce e biomarcadores de hemólise e endoteliais em pacientes adultos com AF.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o perfil dos pacientes com AF através das variáveis sexo, idade, pressão arterial, presença de complicações clínicas e tratamento com HU.
- Avaliar os parâmetros clínicos (pressão arterial) e laboratoriais (perfil hematológico, biomarcadores de hemólise e urinários) de acordo com o uso de Hidroxiuréia nos pacientes com AF.
- Dosar os biomarcadores renais (KIM-1, MCP-1) e de dano endotelial (VCAM-1 e Sindecano-1), comparando sua concentração entre pacientes com AF e grupo controle;
- Associar os biomarcadores KIM-1, MCP-1, VCAM-1 e Sindecano-1 com biomarcadores de hemólise e urinários alterados, com o objetivo de criar um grupo com risco aumentado para alteração renal.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações Éticas**

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o nº de protocolo 3.066.321, pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), protocolo 3.190.166 e pelo Comitê de Ética do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (HEMOCE) sob o nº de protocolo 3.229.549. O trabalho foi executado segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 466/2012.

#### **3.2 Desenho do estudo**

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico em que participaram pacientes com diagnóstico de AF em acompanhamento ambulatorial no HEMOCE e no Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC) em Fortaleza, Ceará. A coleta de dados foi realizada de dezembro de 2017 a dezembro de 2018.

#### **3.3 Local de Estudo**

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas da UFC em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Nefrologia e Doenças Tropicais (LNDDT) da UFC.

#### **3.4 Casuística**

Participaram do estudo 92 pacientes com AF (62 em uso de HU com doses variando de 500 a 1500mg/dia e 25 sem uso de HU), de ambos os sexos, adultos, selecionados de forma voluntária, de acordo com os critérios de seleção da amostra. Como grupo controle foram utilizadas amostras de 34 indivíduos saudáveis doadores de sangue (HbAA) do HEMOCE.

Para fins estatísticos os pacientes com AF foram estratificados:

- De acordo com a hemoglobina: anemia moderada/grave ( $Hb < 8g/dL$ ) e anemia leve ( $Hb \geq 8g/dL$ ) (ABAN *et al.*, 2017).
- Em relação ao número de crises vaso-oclusivas: dor frequente ( $\geq 3$  crises por ano) e dor esporádica ( $< 3$  crises por ano) (DARBARI *et al.*, 2012)

#### **3.5 Seleção da Amostra**

### **3.5.1 Critérios de Inclusão:**

- Pacientes com AF

Adultos de ambos os sexos, com diagnóstico molecular prévio de AF em uso ou não de HU. Os participantes do estudo apresentavam-se no estado basal da doença, segundo os critérios estabelecidos por Ballas (2012): ausência de crises dolorosas por quatro semanas consecutivas; nenhuma admissão hospitalar nos últimos 2-3 dias; histórico negativo de transfusão sanguínea durante os 4 meses anteriores; nenhuma intercorrência de infecção ou inflamação nas últimas 4 semanas; nenhum tratamento com medicamentos que possam afetar o hemograma (antibióticos, imunossupressores, entre outros) durante as últimas 3 semanas (BALLAS, 2012).

- Grupo Controle: Indivíduos adultos (HbAA), de ambos os sexos e sem histórico de doenças renais.

### **3.5.2 Critérios de Exclusão:**

Pacientes com AF diabéticos, tabagistas, gestantes, etilistas e com sorologia positiva para hepatites B e C ou HIV. Pacientes com quadro de insuficiência renal ou que tenham sido submetidos a transplante renal.

No grupo controle foram excluídos os indivíduos diabéticos, gestantes, tabagistas, etilistas e com sorologia positiva para hepatites B e C ou HIV.

## **3.6 Coleta de dados e amostras**

Os indivíduos/pacientes que preencheram os critérios de inclusão foram convidados a participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), recebendo as devidas orientações a respeito do estudo.

Foi coletada uma amostra de sangue em tubo com gel separador e uma amostra de urina para a quantificação dos diversos biomarcadores. Estas amostras foram separadas e armazenadas em freezer a -80°C até o momento da utilização.

Os dados clínico-epidemiológicos e dados laboratoriais (concentração de HbF, dados do hemograma, LDH, contagem de reticulócitos, bilirrubinas e informações sobre a utilização de HU) foram obtidos dos prontuários médicos, sendo estes resultados compatíveis com a data da coleta da amostra biológica.

### 3.7 Avaliação Laboratorial

#### 3.7.1. Avaliação da função renal

Para as análises de creatinina urinária, proteinúria, albuminúria, MCP-1 e KIM-1 foram utilizadas amostras de urina recente.

- Creatinina urinária: Determinada pela formação de um complexo de cor vermelha quando a creatinina reage com picrato em meio alcalino - reação de Jaffé automatizado (Cobas C 111, Roche®).
- Proteinúria: Determinada pelo método Vermelho de pirogalol (Sensiprot - Labtest®). Os resultados foram normalizados pela creatinina urinária.
- Albuminúria: Determinados pelo método de imunoturbidimetria automatizado (Cobas C 111, Roche®). Os resultados foram normalizados pela creatinina urinária.

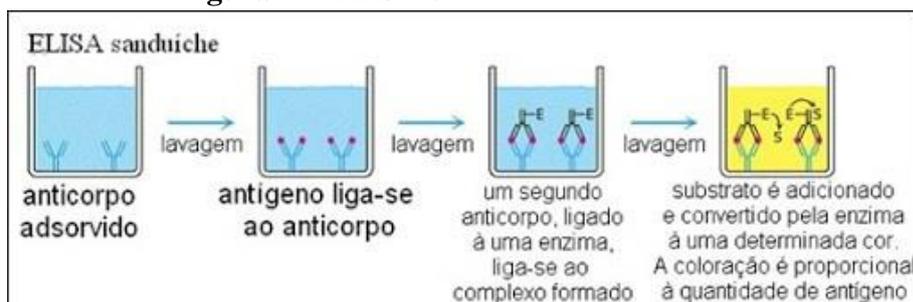
#### 3.7.2 Análise de KIM-1 e MCP-1

Os biomarcadores KIM-1 e MCP-1 foram quantificados por meio da técnica do imunoenensaio ligado a enzima (ELISA) sanduíche, utilizando kit comercial fornecido pelos fabricantes.

Nesse método, o anticorpo de um antígeno específico é, inicialmente, adsorvido na placa de 96 poços (fornecida no kit pelo fabricante). Depois, o antígeno (soro, urina - biomarcador) é adicionado e se liga ao anticorpo. Um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado (Figura 5). Nesse caso, a intensidade da reação é proporcional à quantidade de antígeno presente (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

Os procedimentos foram seguidos de acordo com as normas do fabricante. Para a leitura colorimétrica foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm e filtro de 620 nm. Os resultados das concentrações dos biomarcadores urinários foram normalizados pela creatinina urinária da mesma amostra e expressos em “mg/g-Creatinina”.

**Figura 5** - ELISA sanduíche



Fonte: GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000 (adaptado)

### **3.7.3 Análise de VCAM-1 e Sindecano-1**

A amostra de sangue foi coletada em tubo contendo gel separador e imediatamente centrifugada a 5000rpm por 10 minutos e armazenada em freezer a -80°C para posterior determinação do Sindecano-1 e VCAM-1.

VCAM-1 foi quantificado através da técnica ELISA sanduíche utilizando um kit de teste comercial da Abcam®. Para a leitura colorimétrica foi utilizado o espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm.

A análise de Sindecano-1 foi realizada em amostras de soro por meio da técnica ELISA utilizando kit comercial da Abcam®. A leitura foi realizada no leitor de ELISA, Biotek ELX800 com comprimento de onda de 450nm.

### **3.8 Análise Estatística**

Os dados coletados foram armazenados e organizados em planilhas usando o programa Microsoft Excel (2016). Depois os dados foram transferidos e analisados usando o software SPSS (Chicago, IL, EUA), versão 23 para MACOSX. As variáveis qualitativas ou nominais foram expressas como contagem absoluta e frequência relativa através de porcentagens, sendo comparadas com o teste do qui-quadrado. Variáveis quantitativas foram inicialmente testadas quanto a normalidade dos dados nos diferentes grupos. Depois foram realizados testes de normalidade usando o teste do Shapiro Wilk. Dados normais foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e dados não normais como mediana e amplitude interquartil. Foram usados testes t de Student ou Mann-Whitney para comparação entre dois grupos, e usado o teste de Kruskal-Wallis (pós teste de Dunn) para comparações entre 3 grupos.

Correlações foram aplicadas para avaliar a associação entre variáveis quantitativas, usando o Rho de Spearman. Além disso, foram aplicados modelos de regressão univariada e multivariada para avaliar a associação de parâmetros laboratoriais e biomarcadores com as complicações clínicas na anemia falciforme. O *Odds Ratio* com intervalo de confiança (IC) de 95% foram gerados para tal. Todas as análises consideraram como significativo  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Parâmetros gerais de pacientes com AF e o uso de Hidroxiuréia

Os pacientes com AF avaliados apresentaram idade média de  $40,59 \pm 27,67$  anos, e a maioria (58%) era do sexo feminino. Pacientes em tratamento com HU foram 67% dos casos. Os níveis médios da hemodinâmica vascular de acordo com a pressão arterial foi normal no grupo total. Além disso, foi observado frequência importante de algumas complicações da doença, como anemia grave/moderada (19%), úlcera de perna (20%), litíase biliar (28%) e sintomas de dor frequente (24%) (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características demográficas, clínicas e de complicações estudadas durante o acompanhamento de pacientes com anemia falciforme.

	<b>Anemia Falciforme (n=92)</b>
<b>Sexo (feminino)</b>	53 (58%)
<b>Idade (anos)</b>	$40,59 \pm 27,67$
<b>Pressão arterial sistólica (mmHg)</b>	$110,1 \pm 12,78$
<b>Pressão arterial diastólica (mmHg)</b>	$67,31 \pm 8,12$
<b>Em tratamento com Hidroxiuréia</b>	62 (67%)
<b>Complicações da doença</b>	
Anemia grave/moderada	15 (19%)
Úlcera de perna	17 (20%)
Acidente vascular cerebral	3 (3,8%)
Priaprismo	4 (5,1%)
STA	6 (7,7%)
Infarto ósseo	5 (6,4%)
Hipertensão pulmonar	1 (1,3%)
Litíase biliar	22 (28,2%)
Dor frequente ( $\geq 3$ /ano)	16 (24,2%)
Dor esporádica ( $<3$ crises p ano)	50 (75,8%)

Dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão, e como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. STA- Síndrome torácica aguda

Nos grupos estratificados de acordo com o uso de HU, foram observadas alterações importantes no grupo que não fazia o uso do fármaco. Foi observado que a pressão arterial sistólica se apresentou mais alta ( $p=0,013$ ) em pacientes com AF que não faziam o uso de HU (Tabela 2). Nesse mesmo grupo foram observados significância estatística em uma maior concentração de leucócitos, plaquetas e diminuição da hemoglobina. Além disso, pacientes que não faziam uso de HU tiveram concentração aumentada de reticulócitos, LDH, BT, BD de maneira estatisticamente significativa. Por fim, foi observado no grupo sem tratamento com HU níveis aumentados de albuminúria (mediana= 56,89 (AIQ: 22,59 - 297,36) vs 27,12 (11,77 - 92,85) mg/g-Cr,  $p=0,033$ ). Não foi observado diferença significativa em relação aos níveis de HbF e HbS entre os grupos.

**Tabela 2** - Avaliação de parâmetros clínicos e laboratoriais de acordo com o uso de Hidroxiuréia.

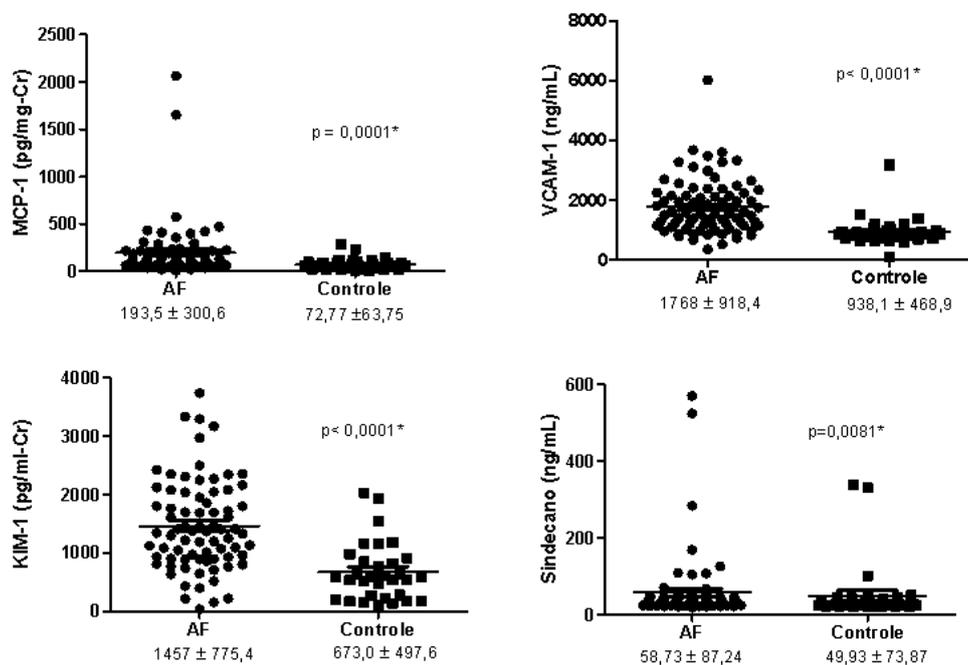
	Uso de Hidroxiuréia		p
	Sim (n=55)	Não (n=24)	
Sexo (feminino)	31 (56)	16 (67)	0,391
Idade (anos)	32,62 ± 15,03	38,21 ± 20,41	
Pressão Arterial Sistólica	107,86 ± 10,57	115,74 ± 15,11	0,013*
Pressão Arterial Diastólica	66,81 ± 7,42	68,35 ± 9,51	0,460
<b>Parâmetros laboratoriais</b>			
Hemoglobina F (%)	13,4 (9,1 - 17,1)	10,4 (8,8 - 13,7)	0,521
Hemoglobina S (%)	80,8 (77,7 - 85,5)	84,15 (80,9 - 86,9)	0,464
Hematócrito (%)	27,4 (24,5 - 31)	25,07 (22,6 - 27,1)	0,069
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	8623 (6700 - 10720)	10770 (9377 - 15330)	0,002*
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> )	335,75 (285,6 - 402)	404,2 (301 - 482,8)	0,045*
Hemoglobina (g/dL)	9,6 (8,4 - 10,6)	8,87 (7,8 - 9,6)	0,030*
Reticulócitos (x10 <sup>3</sup> )	188,3 (150,8 - 250,1)	222,1 (188,6 - 288,6)	0,040*
LDH (U/L)	700,5 (610 - 939)	953 (704 - 1352)	0,017*
Bilirrubina total (mg/dL)	2,37 (1,57 - 3,11)	2,94 (2,36 - 3,41)	0,033*
Bilirrubina direta (mg/dL)	0,38 (0,25 - 0,51)	0,53 (0,38 - 0,67)	0,020*
Bilirrubina indireta (mg/dL)	1,96 (1,18 - 2,69)	2,24 (1,84 - 3,2)	0,090
Proteinúria (mg/g-Cr)	40,2 (23,8 - 3,2)	50,7 (30,2 - 6,2)	0,100
Albuminúria (mg/g-Cr)	27,12 (11,77 - 92,85)	56,89 (22,59 - 297,36)	0,033*

Dados quantitativos foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão para dados normais ou como mediana e amplitude interquartil entre parêntesis para dados não normais. Dados nominais foram expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses. \* $p < 0,05$

## 4.2 Biomarcadores e os parâmetros laboratoriais relacionados ao não uso de HU

Pacientes com AF apresentaram um aumento significativo de KIM-1, MCP-1, VCAM-1 e Sindecano-1 quando comparados a indivíduos saudáveis (Figura 6).

**Figura 6** – KIM-1, MCP-1, VCAM-1 e Sindecano-1 em pacientes com AF e grupo controle



Valores de p obtidos através do Teste de Mann Whitney. \*Significante ao nível de 0,05

Em relação ao grupo que usava HU e o que não fazia uso, não foi observado diferença significativa quanto aos níveis dos biomarcadores renais MCP-1 urinário e KIM-1 urinário; e quanto aos níveis dos biomarcadores endoteliais VCAM-1 e sindecano-1. Entretanto, foi investigado o envolvimento desses biomarcadores com as alterações laboratoriais que estiveram alteradas de acordo com o não uso de HU pelos pacientes com AF, conforme mostrado na Tabela 2.

Considerando todos os pacientes com AF, os biomarcadores urinários MCP-1 e KIM-1 estiveram associados com níveis aumentado de reticulócitos. Quanto aos biomarcadores endoteliais, VCAM-1 aumentado esteve correlacionado com LDH, BT e BD aumentados, e o

sindecano-1 apresentou correlação significativa com níveis elevados de BT e BD, assim como os biomarcadores renais, com reticulócitos (Tabela 3).

**Tabela 3** - Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com parâmetros laboratoriais e clínicos alterados nos pacientes com anemia falciforme.

	MCP-1 urinário		KIM-1 urinário		Sindecano-1 sérico		VCAM-1 sérico	
	<i>Rho</i>	<i>P</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>
<b>Albuminúria (mg/g-Cr)</b>	0,060	0,576	-0,015	0,89	-0,019	0,861	0,117	0,265
<b>PAS (mmHg)</b>	-0,043	0,725	-0,046	0,707	0,162	0,172	0,135	0,254
<b>LDH (U/L)</b>	0,119	0,339	-0,005	0,965	0,075	0,536	0,306	0,01*
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	0,121	0,310	0,145	0,224	0,266	0,037*	0,362	0,001*
<b>Bilirrubina Direta (mg/dL)</b>	0,204	0,086	0,181	0,128	0,278	0,033*	0,289	0,012*
<b>Reticulócitos (<math>\times 10^3/\text{mm}^3</math>)</b>	0,280	0,016*	0,295	0,011*	0,237	0,038*	0,022	0,850

\*Correlações significativas usando o Rho de Spearman. PAS: Pressão arterial sistólica.

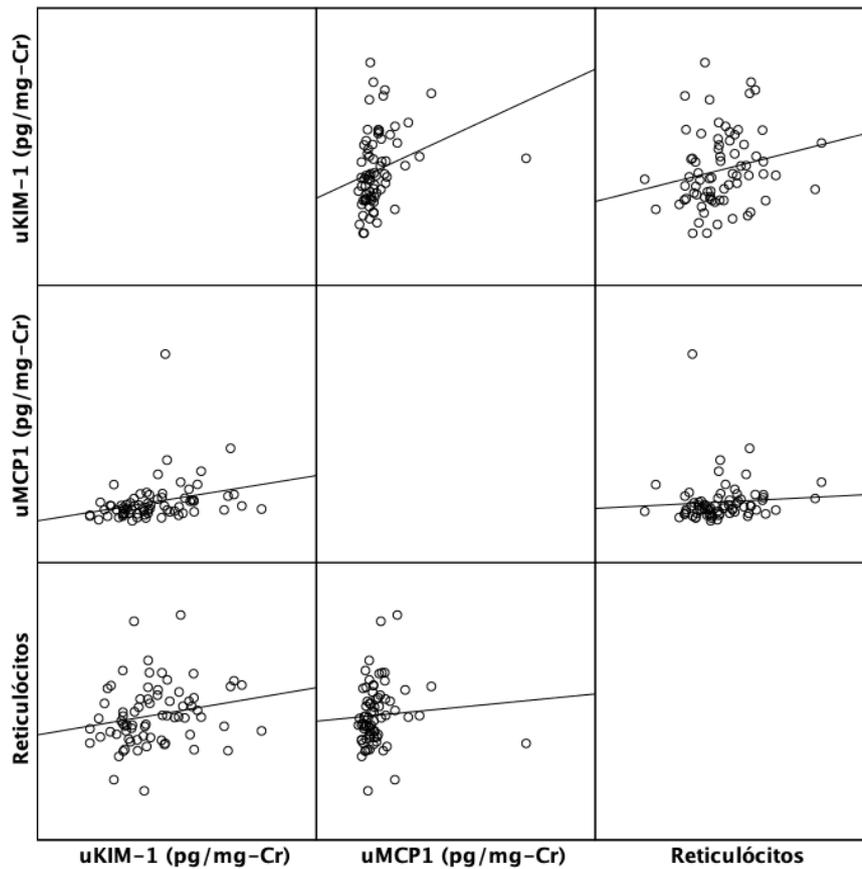
O grupo de pacientes com AF foi estratificado, e foram avaliadas as mesmas correlações apenas entre os pacientes que não faziam uso de HU, avaliando pacientes mais susceptíveis as complicações pela AF. Foi observado um aumento da correlação entre os biomarcadores renais MCP-1 e KIM-1 urinário com a contagem de reticulócitos (Figura 7). Além disso, os níveis de sindecano-1 também tiveram correlação discretamente maior com os reticulócitos, e aumento significativo nas correlações com BT e BD (Tabela 4). Por outro lado, os níveis de VCAM-1 dos pacientes após ajuste com pacientes que não faziam uso de HU perdeu a significância nas correlações, permanecendo apenas com BT.

**Tabela 4** - Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com parâmetros laboratoriais e clínicos alterados nos pacientes com anemia falciforme que não faziam o uso de hidroxiuréia.

	MCP-1 urinário		KIM-1 urinário		Syndecan-1 sérico		VCAM-1 sérico	
	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>	<i>Rho</i>	<i>p</i>
<b>Albuminúria (mg/g-Cr)</b>	-0,312	0,147	-0,391	0,059	-0,354	0,090	-0,032	0,881
<b>PAS (mmHg)</b>	-0,256	0,249	-0,081	0,715	0,266	0,220	0,073	0,742
<b>LDH (U/L)</b>	0,104	0,681	-0,242	0,318	0,028	0,909	0,025	0,92
<b>Bilirrubina total (mg/dL)</b>	-0,280	0,232	-0,195	0,397	0,555	0,009*	0,491	0,024*
<b>Bilirrubina Direta (mg/dL)</b>	0,336	0,147	0,365	0,104	0,565	0,008*	0,415	0,061
<b>Reticulócitos (x10<sup>3</sup> /mm<sup>3</sup>)</b>	0,595	0,004*	0,668	0,001*	0,303	0,049*	0,005	0,982

\*Correlações significativas usando o Rho de Spearman.

**Figura 7** - Gráficos de dispersão em matriz, representando correlações significativas entre MCP-1 urinário, KIM-1 urinário e os níveis de reticulócitos.



\* $p < 0,05$ , em todos os quadrantes.

### **4.3 Complicações renais, clínicas e vasculares de acordo com a contagem de reticulócitos**

Após observada correlação importante entre MCP-1, KIM-1 e sindecano-1 com os níveis de reticulócitos, sobretudo no grupo que não fazia uso de HU, os pacientes com AF foram divididos quanto aos tercis de reticulócitos, e foram comparados os principais parâmetros com alterações observadas (Tabela 5).

Foi observado que o grupo do menor tercil apresentou maior frequência de uso de HU. Quanto aos parâmetros hematológicos, foi observado aumento significativo de leucócitos e neutrófilos. Não foi observado diferença significativa em relação aos níveis de hemoglobina total, HbF e HbS.

Quanto aos parâmetros renais, foi observado níveis significativamente mais altos de albuminúria no terceiro tercil em relação ao primeiro tercil de reticulócitos (mediana= 71,3 (AIQ: 13,7 - 153,8) vs 29,5 (11,7 - 65,5) mg/g-Cr,  $p=0,047$ ). Não foi observada diferença significativa em relação a proteinúria, taxa de filtração glomerular e creatinina sérica (Tabela 5).

Em relação aos biomarcadores renais, uMCP-1 e uKIM-1, foi observado aumento significativo de seus níveis, sobretudo no 3º tercil em relação ao 1º tercil (Tabela 5, e Figuras 8 e 9), apontando para um grupo de risco para alterações renais tanto glomerulares como tubulares.

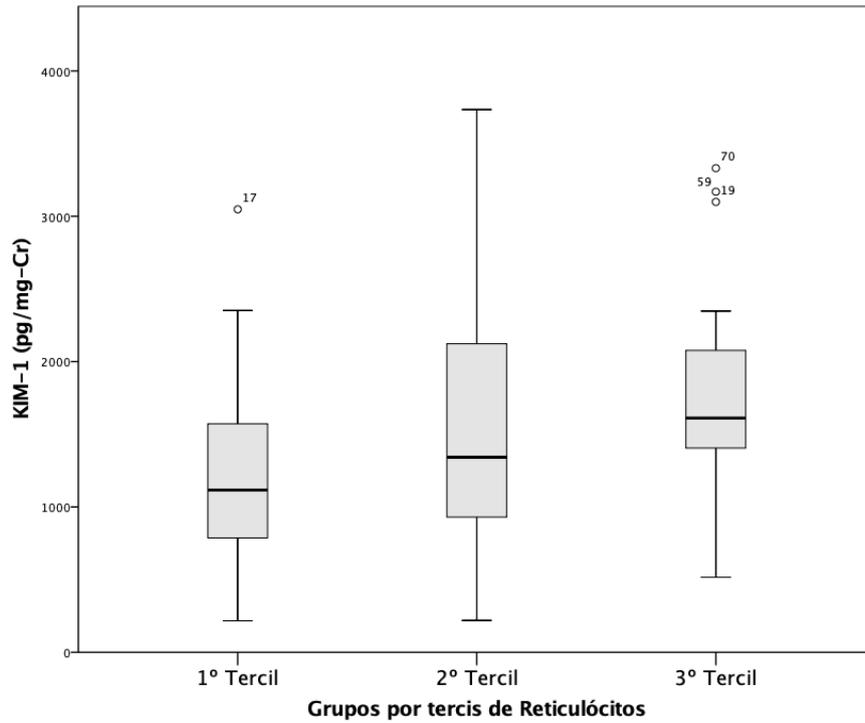
Dentre os biomarcadores endoteliais, apenas o sindecano-1 (glicocálix endotelial) esteve alterado no grupo com 3º tercil (maiores níveis de reticulócitos) (Tabela 5, e Figura 10).

**Tabela 5** - Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com coma contagem de reticulócitos (estratificada por tercís) nos pacientes com AF que não faziam o uso de HU.

	Grupos por Tercís de Reticulócitos			p
	1º Tercil	2º Tercil	3º Tercil	
Idade (anos)	31,7 ± 9,8	33,0 ± 10,5	32,2 ± 10,1	0,890
Sexo (feminino)	15 (60)	17 (65,4)	14 (53,8)	0,697
PAS (mmHg)	111,2 ± 13,3	111,2 ± 13,4	107,9 ± 12,1	0,603
PAD (mmHg)	68,3 ± 8,1	67,8 ± 9,7	66,1 ± 6,2	0,632
Fazia uso de Hidroxiuréia	22 (88)	15 (58)	16 (64)	0,047*
Hemoglobina (g/dL)	9,6 (8,6 - 10,3)	8,95 (8,1 - 10,6)	9,45 (8,4 - 10,4)	0,793
Hemoglobina fetal (%)	13,55 (9,7 - 17,9)	10,2 (9 - 15,6)	12,55 (8,8 - 17,2)	0,283
Hemoglobina S (%)	80,65 (75,9 - 84,25)	84,4 (78,7 - 86,2)	83,35 (77,8 - 86,9)	0,274
Leucócitos (/mm <sup>3</sup> )	7742 (6693 - 9830)	10120 (8200 - 11850)	10245 (9360 - 12690)	0,013*
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3367 (2729 - 5432)	5241 (4014 - 7538)	5381 (4195 - 6328)	0,042*
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	326 (288 - 495)	346 (279 - 411)	361 (312 - 417)	0,503
LDH (U/L)	699 (573 - 881)	826,5 (605 - 1117)	848 (661 - 1022)	0,394
BT (mg/dL)	2,4 (1,51 - 3,07)	2,64 (2,26 - 3,15)	2,67 (2,02 - 4,07)	0,472
BD (mg/dL)	0,38 (0,25 - 0,52)	0,44 (0,27 - 0,6)	0,43 (0,31 - 0,67)	0,605
Creatinina sérica (mg/dL)	0,58 ± 0,19	0,55 ± 0,2	0,57 ± 0,21	0,873
TFG (ml/min/1.73 m <sup>2</sup> )	136,4 ± 21,8	130,8 ± 24,33	134,7 ± 14,1	0,619
Proteinúria (mg/g-Cr)	29,4 (22,1 - 43,9)	35,5 (22,8 - 67,0)	44,8 (28,8 - 63,0)	0,147
Albuminúria (mg/g-Cr)	29,5 (11,7 - 65,5)	31,73 (13,9 - 171,8)	71,3 (13,7 - 153,8)	0,047*
<b>Biomarcadores</b>				
uMCP-1 (pg/mg-Cr)	174 (98 - 248)	149 (80 - 209)	255 (145 - 341)	0,033*
uKIM-1 (pg/ml-Cr)	1116,3 (786 - 1571)	1341 (929 - 2123)	1611 (1405 - 2076)	0,043*
VCAM-1 (ng/mL)	1320 (1155 - 2151)	1951 (1142 - 2566)	1402 (1225 - 1865)	0,455
Sindecano-1 (ng/mL)	36,9 (24,9 - 40,8)	39,8 (36,6 - 47,7)	40,5 (32,8 - 55,3)	0,040*

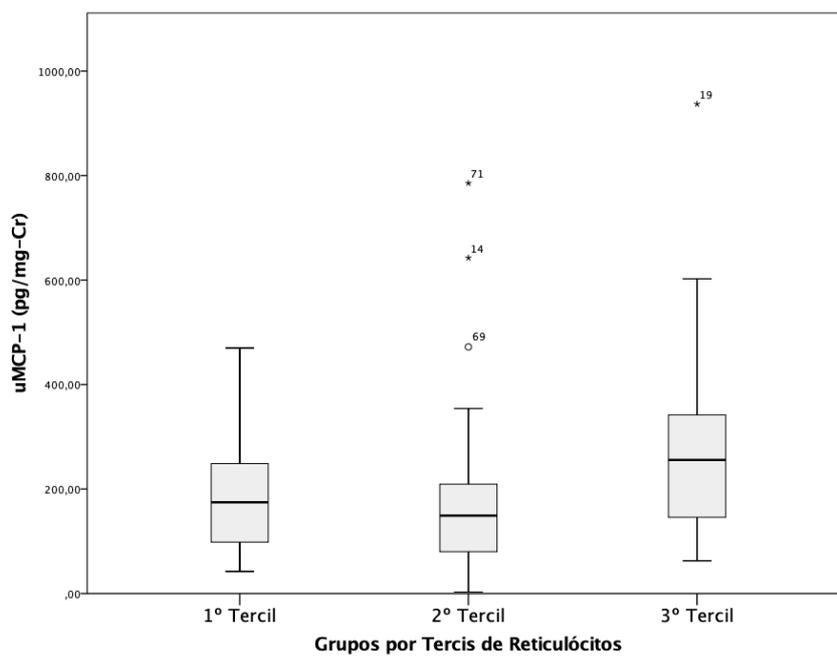
Dados quantitativos foram expressos como média ± desvio padrão para dados normais ou como mediana e amplitude interquartil entre parêntesis para dados não normais. Dados nominais foram expressos como frequência absoluta e porcentagem entre parênteses.

**Figura 8** - Níveis de KIM-1 urinário de acordo com tercís dos níveis de reticulócitos para criação de grupo de risco.



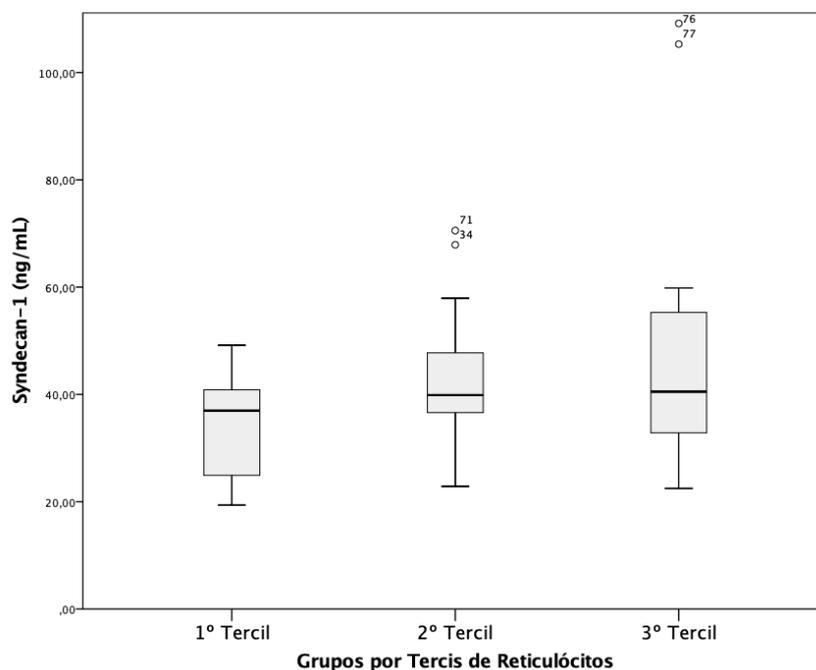
$p < 0,05$ , entre 3º tercil e 1º tercil.

**Figura 9** - Níveis de MCP-1 urinário de acordo com tercís dos níveis de reticulócitos para criação de grupo de risco.



$p < 0,05$ , entre 3º tercil vs 1º e 2º tercís.

**Figura 10** - Níveis de Sindecano-1 sistêmico de acordo com tercis dos níveis de reticulócitos para criação de grupo de risco.



$p < 0,05$ , entre 3º tercil vs 1º tercil.

#### **4.4 Influência dos reticulócitos juntamente com o uso de HU e anemia grave/moderada nos níveis dos biomarcadores renais e endoteliais**

A contagem de reticulócitos e outras variáveis de complicações clínicas da AF foram testadas em modelos de regressão para avaliar fatores que possam estar contribuindo para o aumento dos níveis dos biomarcadores renais e do sindecano-1. Primeiramente, regressões univariadas mostraram que no grupo estudado, cada aumento de 50 mil reticulócitos contribuía para aumento em cerca de 113 pg/mg-Cr de uKIM-1 e de 50,7 pg/mg-Cr de uMCP-1 (coeficiente beta,  $p < 0,05$ ). Em relação ao sindecano-1, tivemos aumento de 3,67 ng/ml, porém não foi significativo ( $p = 0,559$ ) (Tabela 6).

Em modelos multivariados foram selecionadas e adicionados as variáveis: uso de HU e anemia grave/moderada, após investigações com diversas variáveis. No modelo 1 (adicionando o não uso de HU), houve um aumento da concentração de KIM-1 e MCP-1 para cada aumento de 50 mil reticulócitos. No modelo 2, ao incluir também a anemia grave/moderada, houve outro incremento importante desses mesmos níveis, apontando grupos de risco para o aumentos desses biomarcadores (Tabela 6).

**Tabela 6** - Correlações entre biomarcadores renais e endoteliais com a contagem de reticulócitos nos pacientes com AF que não faziam o uso de HU.

	<b>Aumento de 50 mil reticulócitos</b>			
	<b>Coefficiente Beta</b>	<b>t</b>	<b>IC - 95%</b>	<b>p</b>
<b>Regressão univariada</b>				
Variável dependente (uKIM-1)	113,1	2,001	0,408 - 225,8	0,049*
Variável dependente (uMCP-1)	50,7	2,036	1,051 - 100,4	0,045*
Variável dependente (Sindecano-1)	3,67	0,578	(-8,80 - 16,16)	0,559
<b>Modelo 1: não uso de Hidroxiuréia</b>				
Variável dependente (uKIM-1)	125,5	2,126	7,763 - 243,2	0,037*
Variável dependente (uMCP-1)	55,8	2,177	4,,694 - 107,0	0,033*
Variável dependente (Sindecano-1)	5,65	0,878	(-7,1 - 18,5)	0,383
<b>Modelo 2: não uso de Hidroxiuréia e anemia grave/moderada</b>				
Variável dependente (uKIM-1)	137,5	2,345	20,94 - 253,9	0,021*
Variável dependente (uMCP-1)	58,8	2,235	6,259 - 110,3	0,029*
Variável dependente (Sindecano-1)	5,82	0,891	(-7,2 - 18,8)	0,376

IC: intervalo de confiança. uMCP-1: MCP-1 urinário; uKIM-1: uKIM-1 urinário.

## 5 DISCUSSÃO

### Perfil clínico e do tratamento

A AF é uma hemoglobinopatia caracterizada por hemólise crônica e eventos vasculares de repetição, o que pode acarretar em danos a órgãos, incluindo anormalidades no sistema nervoso central, ossos e articulações, sistema cardiovascular, pulmão, trato gastrointestinal e rins, ocasionando manifestações clínicas. Os pacientes do presente estudo apresentaram sintomas relacionados à fisiopatologia da AF, sendo os de maior frequência anemia grave/moderada, úlceras de perna, litíase biliar, crises de dor, priapismo e STA, corroborando com o estudo de Pinto e colaboradores (2019) (DA SILVA JUNIOR; LIBÓRIO; DE FRANCESCO DAHER, 2011; KATO *et al.*, 2009; KATO; GLADWIN; STEINBERG, 2007; PINTO *et al.*, 2019; SUNDARAM *et al.*, 2011).

A maioria do grupo de pacientes estudados estava em uso contínuo de HU. Este é o principal medicamento utilizado no tratamento da AF e seu uso está associado a melhora das manifestações clínicas gerais (NADER *et al.*, 2018; NAHAVANDI M *et al.*, 2002).

Pacientes em tratamento com HU no presente estudo apresentaram uma diminuição da pressão sistólica quando comparados aos que não faziam uso do medicamento. Vários estudos indicaram que pacientes com AF, em comparação com indivíduos controle, apresentaram pressão arterial sistêmica reduzida e incidência reduzida de hipertensão arterial sistêmica. Esses achados na AF podem ser devido ao defeito tubular renal responsável pelo aumento da excreção de sódio e água, que pode diminuir a expansão do volume plasmático necessária para a hipertensão sustentada e, assim, promover pressões arteriais mais baixas (DE JONG, 1982; JOHNSON; GIORGIO, 1981; ERNST, 200; NATH; KATUSIC; GLADWIN, 2004; PEGELOW *et al.*, 1997). O estudo de Aygun e colaboradores (2012), no entanto, não encontrou diferença significativa na pressão sistólica entre pacientes sem HU e os que faziam tratamento com este medicamento por um período de 3 anos.

### Influência do uso da Hidroxiuréia nos biomarcadores convencionais de hemólise e da função renal

Os pacientes que não estavam utilizando a HU apresentaram ainda um aumento significativo dos parâmetros leucócitos, plaquetas, reticulócitos, LDH, BT, BD e albuminúria, e uma diminuição da hemoglobina total, quando comparados com os pacientes que estavam sendo tratados com este medicamento. Um estudo realizado na mesma população de pacientes

evidenciou a influência do tratamento com HU nos biomarcadores de hemólise (LAURENTINO, *et al.*, 2018). Pacientes que estavam tomando HU em doses menores (< 10 mg/kg/dia ) apresentaram um aumento de LDH em relação aos que tomavam HU em maior dose (> 10 mg/kg/dia), enquanto pacientes que foram tratados por um tempo maior (50 meses) apresentaram uma redução na contagem de reticulócitos em relação aos que tomavam HU a menos tempo (menor que 50 meses de tratamento). Sabe-se que o uso da HU oferece muitos benefícios para a AF, a contagem de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, reduzindo a hemólise e a dor e prevenindo eventos agudos e crônicos (AGRAWAL *et al.*, 2014; MCGANN; WARE, 2015; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017).

Além disso, outros estudos (BARTOLUCCI *et al.*, 2016; ABAN *et al.*, 2017) também evidenciaram a associação entre a não utilização da HU e a presença de albuminúria, corroborando com os nossos achados. Foi sugerido como mecanismo de ação o fato de a HU diminuir a hemólise e falcização das hemácias, levando à diminuição da lesão renal isquêmica (MCKIE, K. *et al.*, 2007; AYGUN *et al.*, 2013; MILLER *et al.*, 2009; AGRAWAL *et al.*, 2014; ABAN *et al.*, 2017).

O principal benefício do uso da HU é o aumento dos níveis de HbF, e apesar de ter sido observada uma tendência de aumento da HbF nos pacientes em uso de HU do estudo, esse resultado não foi significativamente estatístico. Essa diferença pode não ter sido evidenciada porque alguns dos pacientes que não utilizavam HU, não o faziam por apresentarem um bom estado geral (ausência de complicações clínicas graves como STA, AVC, priapismo, etc...) ou por apresentarem uma elevação da HbF de forma natural (persistência da hemoglobina fetal), portanto, sem indicação clínica e laboratorial do uso da HU (CANÇADO *et al.*, 2009; AGRAWAL *et al.*, 2014; SAÚDE, 2018).

### **Alterações renais e endoteliais na Anemia Falciforme**

A HbS apresenta uma tendência de se polimerizar na região medular renal devido à baixa pressão local de oxigênio, baixo pH e alta osmolaridade, favorecendo a desidratação e falcização dos eritrócitos. A vaso-oclusão ocasionada pelos eritrócitos falcizados causa isquemia tecidual, resultando em uma cascata adicional de eventos patológicos, incluindo hemólise, disfunção endotelial, inflamação, hipercoagulabilidade, lesão por reperfusão e estresse oxidativo, que ocasionam lesões ao endotélio renal aumentando a expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1, uma glicoproteína importante na migração de células inflamatórias e na interações leucócito-endotélio (DE MELO BEZERRA CAVALCANTE *et*

*al.*, 2016; KELLY *et al.*, 1994; KELLY; WILLIAMS; *et al.*, 1996; MAIGNE *et al.*, 2010; SUNDARAM *et al.*, 2011).

A nefropatia falciforme (NF) é uma das principais complicações crônicas da AF que começa na infância e pode progredir até insuficiência renal. Fatores genéticos, gravidade da anemia e gravidade geral da doença são fatores de risco para NF. Os glomérulos, túbulos renais e *vasa recta* são danificados por eventos de isquemia-reperfusão causados pela falcização intramedular. Agentes vasodilatadores como prostaglandinas e NO aumentam o fluxo sanguíneo para os glomérulos remanescentes com conseqüente hiperfiltração e hipertrofia glomerular. Eventualmente, a hipertensão intraglomerular leva à capacidade de filtração prejudicada e à perda da seletividade glomerular de macromoléculas e à albuminúria. Além disso, a endocitose epitelial tubular aumentada de proteínas contribui para lesão tubulointerstitial e fibrose. Acredita-se ainda que a hemólise contribua para a vasodilatação e inflamação (HAYMANN *et al.*, 2010; MAIGNE *et al.*, 2010; BECKER, 2011; DA SILVA; LIBÓRIO; DAHER, 2011; NATH; HEBBEL, 2015)

Os pacientes com AF apresentaram um aumento dos biomarcadores de lesão renal precoce KIM-1 e MCP-1 e dos parâmetros de lesão endotelial VCAM-1 e sindecano-1 quando comparados ao grupo controle, resultados semelhantes foram encontrados em outros estudos (DOS SANTOS *et al.*, 2015; HAMIDEH *et al.*, 2014; SUNDARAM *et al.*, 2011; VAN BEERS, EDUARD J. *et al.*, 2008). Em relação ao tratamento, não foi evidenciado diferença nos biomarcadores entre pacientes com AF que faziam uso ou não da HU. Entretanto, no trabalho de Santos e colaboradores (2014) os pacientes com AF em uso de HU apresentaram uma diminuição de MCP-1 quando comparados aos pacientes sem tratamento. Sabe-se que os benefícios do tratamento com HU são variáveis, uma vez que a resposta terapêutica está interligada com a gravidade clínica da AF, incluindo a concentração de HbF, os haplótipos da  $\beta$ -globina, a co-associação com  $\alpha$ -talassemia e a presença de polimorfismos genéticos em regiões promotoras da  $\gamma$ -globina. Além disso, a variabilidade da resposta pode estar associada à variação individual no metabolismo do fármaco (COKIC *et al.*, 2008; CANÇADO *et al.*, 2009).

A AF é caracterizada por ativação endotelial constante, causada pela hemólise crônica com conseqüente liberação EROs e hemoglobina livre, culminando na diminuição da disponibilidade do NO e oclusão vascular (KELLY *et al.*, 1994, 1996; CAVALCANTE *et al.*, 2016). A destruição do NO pela hemoglobina livre também pode contribuir para o comprometimento da função endotelial vascular através da ativação transcricional de moléculas

de adesão, incluindo VCAM-1 e E-selectina, além de potentes vasoconstritores como a endotelina-1 (KELLY *et al.*, 1994, 1996; CAVALCANTE *et al.*, 2016).

Lesões ao endotélio renal aumentam a expressão de moléculas de adesão, como VCAM-1, uma glicoproteína importante na migração de células inflamatórias e na interações leucócito-endotélio, e sindecano-1, liberado quando há dano ao glicocálice, apresentando-se aumentado em condições de isquemia, inflamação e hipóxia (VAN BEERS, E. J. *et al.*, 2008; BRAZ, 2014; DE MELO BEZERRA CAVALCANTE *et al.*, 2016). Esses dados apoiam os resultados encontrados no presente estudo, em que os pacientes com AF sem uso de HU apresentaram uma associação dos biomarcadores endoteliais VCAM-1 e sindecano-1 com o aumento de BT, BD e reticulócitos, evidenciando o importante papel da hemólise na fisiopatologia da lesão endotelial na AF. O estudo de Vilas-Boas e colaboradores (2010) em 50 pacientes adultos com AF, no Nordeste do Brasil, também encontrou uma associação entre biomarcadores de endotélio (VCAM-1 e ICAM-1) e biomarcadores de hemólise (LDH, aspartato aminotransferase e contagem de reticulócitos), corroborando com nossos resultados (VILAS-BOAS *et al.*, 2010).

A hemólise crônica libera hemoglobina livre e grupamento heme, sendo este de particular relevância na lesão renal, pois o rim é o principal local de depuração e degradação da hemoglobina em condições de hemólise grave. O heme apresenta ações pró-oxidantes e de desnaturação oxidativa de lipídios, DNA, proteínas citoesqueléticas e outras, e os leucócitos ativados, quando expostos ao heme, podem produzir EROs e citocinas pró-inflamatórias que ativam NF- $\kappa$ B no endotélio, aumentando a expressão de moléculas de adesão como VCAM-1, ICAM-1 e P-selectina, que promovem a adesão de glóbulos vermelhos e leucócitos falciformes, alterando o tônus vascular e promovendo a vaso-oclusão e subsequente isquemia tecidual (BELCHER *et al.*, 2010; GONZALEZ-MICHACA *et al.*, 2004).

### **Associação de biomarcadores de hemólise com os biomarcadores da função renal**

MCP-1, KIM-1 e sindecano-1 apresentaram uma correlação positiva com a contagem de reticulócitos, sobretudo no grupo de pacientes que não fazia uso de HU. Quando divididos quanto aos tercís de reticulócitos, foi observado que o grupo do menor tercil apresentou maior frequência de uso de HU, sugerindo que os pacientes em tratamento apresentaram menos hemólise, mostrando o efeito protetor da HU (AGRAWAL *et al.*, 2014; LAURIN *et al.*, 2014; NEVITT; JONES; HOWARD, 2017)

O terceiro tercil apresentou níveis significativamente mais altos de albuminúria e concentração de MCP-1 e KIM-1 em relação ao primeiro tercil de reticulócitos, apontando um grupo de risco para alterações renais glomerulares e tubulares. Uma forte associação entre albuminúria e um parâmetro de hemólise (LDH) também foi encontrada por Hamideh e colaboradores (2014). A presença de anemia grave/moderada devido à hemólise crônica na AF também foi associada à doença renal em pacientes pediátricos no estudo de Aban e colaboradores (2016). Um outro estudo encontrou uma correlação de LDH com proteinúria e albuminúria, sugerindo que LDH possa ser utilizado com um marcador precoce para o risco de envolvimento renal entre pacientes com AF (ABAN *et al.*, 2017; GURKAN *et al.*, 2010). Em relação aos biomarcadores endoteliais, sindecano-1 (glicocálix endotelial) esteve alterado no grupo com 3º tercil (maiores níveis de reticulócitos), indicando a influência da hemólise na lesão endotelial na AF.

A contagem de reticulócitos apresentou grande relevância e influência nas concentrações dos biomarcadores renais e endoteliais estudados. Estudos mostram um aumento da contagem de reticulócitos em pacientes com AF, estando este parâmetro associado ao aumento do processo hemolítico (DAMANHOURI *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2015).

A hemólise crônica também é um fator de risco para hiperfiltração, proteinúria e NF e complicações da AF, como hipertensão pulmonar, fortemente associadas à hemólise e vasculopatia. Essa hemólise está associada à hiperfiltração, um fato que pode ser intrigante, visto que a hemólise geralmente induz um estado vasoconstritivo renal (depleção de NO pela arginase), enquanto a hiperfiltração é frequentemente acompanhada de vasodilatação e hiperperfusão na AF. Entretanto, na AF, a hemólise por si só pode induzir vasodilatação regional ou sistêmica, devido à natureza instável da hemoglobina falciforme. Essa instabilidade leva à liberação do heme e à indução da heme oxigenase-1 (HO-1), uma enzima que degrada o heme, reduz a toxicidade oxidativa mediada por heme e confere citoproteção, exercendo efeitos vasorelaxantes através da geração de ações de monóxido de carbono e de eliminação de oxidantes, favorecendo assim a hiperfiltração e lesão no rim (POWARS *et al.*, 1991; BELCHER *et al.*, 2010; CHINTAGARI *et al.*, 2015; GONZALEZ-MICHACA *et al.*, 2004; NATH; KATUSIC, 2012; NATH; KATUSIC; GLADWIN, 2004; SARAF *et al.*, 2015).

O rim na AF apresenta o chamado paradoxo da perfusão citado por Nath e colaboradores (2004), uma diferença hemodinâmica entre macro e microcirculação no qual o rim é provavelmente o melhor exemplo. No rim em geral ocorre hiperperfusão e hiperfiltração, alterações hemodinâmicas que são caracterizadas por taxas de fluxo sanguíneo e plasma renais

variavelmente aumentadas, taxas de filtração glomerular aumentada (TFG) e, como descrito em alguns estudos, resistência vascular renal reduzida. Na medula renal, entretanto, há uma tendência à hipóxia relativa, osmolaridade aumentada e pH reduzido, os quais estimulam a polimerização da HbS, hipoperfusão devido a doença vasooclusiva como consequência da oclusão da *vasa recta* pela hemácias falcizadas, levando à isquemia medular (ETTELDORF *et al.*, 1955; NATH; KATUSIC; GLADWIN, 2004; LAURENTINO, *et al.*, 2019).

Por fim, a presença de anemia grave/moderada, o não uso de HU e o aumento de reticulócitos apresentaram uma influência no aumento da concentração dos biomarcadores renais KIM-1 e MCP-1, apontando grupos de risco para o aumento desses biomarcadores. O estudo de novos biomarcadores de dano renal para o diagnóstico precoce e o conhecimento de fatores que possam aumentar o risco do desenvolvimento de NF são de extrema importância visto que a lesão ao rim se inicia desde a infância nos pacientes com AF e que quanto mais precoce forem iniciadas intervenções de nefroproteção, mais eficaz será a prevenção da progressão do dano renal.

"O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001".

## 5 CONCLUSÃO

- Pacientes sem uso de HU apresentaram um aumento significativo da pressão sistólica, contagem de leucócitos, plaquetas, reticulócitos, LDH, BT, BD e albuminúria e uma diminuição da hemoglobina total em relação aos pacientes com AF que faziam tratamento com HU.
- Pacientes com AF apresentaram um aumento significativo de MCP-1 e KIM-1 urinários e Sindecano-1 e VCAM-1 séricos, quando comparados ao grupo controle.
- Pacientes com AF sem HU apresentaram uma associação de KIM-1 e MCP-1 com o aumento da contagem de reticulócitos.
- Sindecano-1 apresentou uma associação com o aumento dos biomarcadores de hemólise reticulócitos, BT e BD; e VCAM-1 uma associação com o aumento da BT.
- O menor tercil da contagem de reticulócitos esteve associado com os pacientes que apresentaram maior frequência de uso de HU.
- O não uso de HU, a presença de anemia grave/moderada e o aumento da contagem de reticulócitos apresentaram uma influência nas concentrações de KIM-1 e MCP-1.

## REFERÊNCIAS

- ABAN, I. *et al.* Severe anemia early in life as a risk factor for sickle-cell kidney disease. *Blood*, v. 129, n. 3, p. 385–387, 19 jan. 2017.
- ADEKILE, A. D. What's new in the pathophysiology of sickle cell disease? *Medical Principles and Practice: International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre*, v. 22, n. 4, p. 311–312, 2013.
- AGRAWAL, R. K. *et al.* Hydroxyurea in Sickle Cell Disease: Drug Review. *Indian Journal of Hematology & Blood Transfusion*, v. 30, n. 2, p. 91–96, jun. 2014.
- ALPHONSUS, C. S.; RODSETH, R. N. The endothelial glycocalyx: a review of the vascular barrier. *Anaesthesia*, v. 69, n. 7, p. 777–784, jul. 2014.
- ARDUINI, G. A. O. *et al.* Mortality by sickle cell disease in Brazil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 39, n. 1, p. 52–56, mar. 2017.
- AYGUN, B. *et al.* Hydroxyurea treatment decreases glomerular hyperfiltration in children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, v. 88, n. 2, p. 116–119, fev. 2013.
- BALLAS, S. K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. *American Journal of Hematology*, v. 87, n. 3, p. 338–338, 1 mar. 2012.
- BARTOLUCCI, P. *et al.* Six Months of Hydroxyurea Reduces Albuminuria in Patients with Sickle Cell Disease. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, v. 27, n. 6, p. 1847–1853, 2016.
- BECKER, A. M. Sickle cell nephropathy: challenging the conventional wisdom. *Pediatric Nephrology*, v. 26, n. 12, p. 2099–2109, dez. 2011.
- BELCHER, J. D. *et al.* Heme Degradation and Vascular Injury. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 12, n. 2, p. 233–248, 15 jan. 2010.
- BRAZ, M. B. M. *Avaliação do dano endotelial, de glicocálice e tubular na lesão renal aguda da leptospirose.* 2014a. 2014.
- CANÇADO, R. D. *et al.* Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 31, n. 5, p. 361–366, 2009.
- CERQUEIRA, B. A. V. *et al.* Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: Contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. *Cytokine*, v. 56, n. 2, p. 471–476, 1 nov. 2011.
- CHINTAGARI, N. REDDY. *et al.* Haptoglobin attenuates hemoglobin-induced heme oxygenase-1 in renal proximal tubules cells and kidneys of a mouse model of sickle cell disease. *Blood cells, molecules & diseases*, v. 54, n. 3, p. 302–306, mar. 2015.
- COKIC, V. P. *et al.* Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. *Blood*, v. 111, n. 3, p. 1117–1123, 1 fev. 2008.

DA SILVA, G. B.; LIBÓRIO, A. B.; DAHER, E. D. F. New insights on pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sickle cell nephropathy. *Annals of Hematology*, v. 90, n. 12, p. 1371–1379, dez. 2011.

DAMANHOURI, G. A. *et al.* Clinical biomarkers in sickle cell disease. *Saudi Journal of Biological Sciences*, v. 22, n. 1, p. 24–31, jan. 2015.

DARBARI, D. S. *et al.* Markers of severe vaso-occlusive painful episode frequency in children and adolescents with sickle cell anemia. *The Journal of Pediatrics*, v. 160, n. 2, p. 286–290, fev. 2012.

DE JONG, P. E. Blood Pressure in Sickle Cell Disease. *Archives of Internal Medicine*, v. 142, n. 6, p. 1239, 1 jun. 1982.

DE MELO BEZERRA CAVALCANTE, C. T. *et al.* Syndecan-1 improves severe acute kidney injury prediction after pediatric cardiac surgery. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, v. 152, n. 1, p. 178- 186.e2, jul. 2016.

DEVARAJAN, P. Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Current Opinion in Pediatrics*, v. 23, n. 2, p. 194–200, abr. 2011.

DOS SANTOS, T. E. DE J. *et al.* Monocyte chemoattractant protein-1: a potential biomarker of renal lesion and its relation with oxidative status in sickle cell disease. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, v. 54, n. 3, p. 297–301, mar. 2015.

NOVELLI, P. S.; GLADWIN, M.T. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. v. 14, p. 261–90, 17 out. 2018.

ERNST, A. A. *et al.* Blood pressure in acute vaso-occlusive crises of sickle cell disease. *Southern Medical Journal*, v. 93, n. 6, p. 590–592, jun. 2000.

ETTELDORF, J. N. *et al.* Renal hemodynamic studies in adults with sickle cell anemia. *The American Journal of Medicine*, v. 18, n. 2, p. 243–248, 1 fev. 1955.

GOLDSBY RA, KINDT TJ, OSBORNE BA. Cells and organs of the immune system. In RA Goldsby, TJ Kindt, BA Osborne, *Kuby Immunology*, WH Freeman and Company, New York, p. 27-59., 2000.

GONZALEZ-MICHACA, L. *et al.* Heme: a determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 286, n. 2, p. F370–F377, 1 fev. 2004.

GURKAN, S. *et al.* Lactate dehydrogenase as a predictor of kidney involvement in patients with sickle cell anemia. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, v. 25, n. 10, p. 2123–2127, out. 2010.

HAMIDEH, D. *et al.* Albuminuria correlates with hemolysis and NAG and KIM-1 in patients with sickle cell anemia. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, v. 29, n. 10, p. 1997–2003, out. 2014.

HARIRI, E. *et al.* Sickle cell nephropathy: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *International Urology and Nephrology*, v. 50, n. 6, p. 1075–1083, jun. 2018.

HAYMANN, J.-P. *et al.* Glomerular hyperfiltration in adult sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, v. 5, n. 5, p. 756–761, maio 2010.

IANNONE, R. *et al.* Bone marrow transplantation for sickle cell anemia: progress and prospects. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 44, n. 5, p. 436–440, maio 2005.

JOHNSON, C. S.; GIORGIO, A. J. Arterial Blood Pressure in Adults With Sickle Cell Disease. *Archives of Internal Medicine*, v. 141, n. 7, p. 891–893, 1 jun. 1981.

KATO, G. J. *et al.* Vasculopathy in Sickle Cell Disease: Biology, Pathophysiology, Genetics, Translational Medicine and New Research Directions. *American journal of hematology*, v. 84, n. 9, p. 618–625, set. 2009.

KATO, G. J.; GLADWIN, M. T.; STEINBERG, M. H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical subphenotypes. *Blood reviews*, v. 21, n. 1, p. 37–47, jan. 2007.

KELLY, K. J. *et al.* Antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects the kidney against ischemic injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 91, n. 2, p. 812–816, 1994.

KELLY, K. J.; WILLIAMS, W. W.; *et al.* Intercellular adhesion molecule-1-deficient mice are protected against ischemic renal injury. *Journal of Clinical Investigation*, v. 97, n. 4, p. 1056–1063, 15 fev. 1996.

KOHNE, E. Hemoglobinopathies: clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Deutsches Arzteblatt International*, v. 108, n. 31–32, p. 532–540, ago. 2011.

KOYNER, J. L. *et al.* Urinary biomarkers in the clinical prognosis and early detection of acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology: CJASN*, v. 5, n. 12, p. 2154–2165, dez. 2010.

LAURENTINO, MARILIA R. *et al.* Analysis of BCL11A gene polymorphisms and hemolysis parameters in patients with sickle-cell disease. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 54, n. 3, p. 132–137, jun. 2018.

LAURENTINO, MARÍLIA ROCHA *et al.* Non-invasive urinary biomarkers of renal function in sickle cell disease: an overview. *Annals of Hematology*, v. 98, n. 12, p. 2653–2660, 1 dez. 2019.

LAURIN, L.-P. *et al.* Hydroxyurea is associated with lower prevalence of albuminuria in adults with sickle cell disease. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, v. 29, n. 6, p. 1211–1218, jun. 2014.

LE JONCOUR, A. *et al.* Red urine, updated for the nephrologist: a case report. *BMC nephrology*, v. 19, n. 1, p. 133, 8 jun. 2018.

LEBENSBURGER, J. *et al.* Protective role of hemoglobin and fetal hemoglobin in early kidney disease for children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, v. 86, n. 5, p. 430–432, maio 2011.

- MAIGNE, G. *et al.* Glomerular lesions in patients with sickle cell disease. *Medicine*, v. 89, n. 1, p. 18–27, jan. 2010.
- MANFREDINI, V. *et al.* A Fisiopatologia da Anemia Falciforme. v. 19, n. 1/2, 2007.
- MCGANN, P. T.; WARE, R. E. Hydroxyurea therapy for sickle cell anemia. *Expert opinion on drug safety*, v. 14, n. 11, p. 1749–1758, 2015.
- MCKIE, K. *et al.* Prevalence, Prevention, and Treatment of Microalbuminuria and Proteinuria in Children With Sickle Cell Disease. *Journal of Pediatric Hematology/oncology*, v. 29, n. 3, p. 140–144, mar. 2007.
- MENESES, G. C. *et al.* Endothelial Glycocalyx Damage is Associated with Leptospirosis Acute Kidney Injury. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 92, n. 3, p. 611–616, 4 mar. 2015.
- MILLER, S. T. *et al.* Urine concentrating ability in infants with sickle cell disease: baseline data from the phase III trial of hydroxyurea (BABY HUG). *Pediatric Blood & Cancer*, v. 54, n. 2, p. 265–268, fev. 2010.
- MOREIRA, J. A. *et al.* Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, n. 3, p. 167–171, 2015.
- NADER, E. *et al.* Hydroxyurea therapy modulates sickle cell anemia red blood cell physiology: Impact on RBC deformability, oxidative stress, nitrite levels and nitric oxide synthase signalling pathway. *Nitric Oxide*, v. 81, p. 28–35, 1 dez. 2018.
- NAHAVANDI M *et al.* Nitric oxide and cyclic GMP levels in sickle cell patients receiving hydroxyurea. v. 119, n. 3, p. 855–7, 2002.
- NATH, K. A.; HEBBEL, R. P. Sickle cell disease: renal manifestations and mechanisms. *Nature reviews. Nephrology*, v. 11, n. 3, p. 161–171, mar. 2015.
- NATH, K. A.; KATUSIC, Z. S. Vasculature and Kidney Complications in Sickle Cell Disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, v. 23, n. 5, p. 781–784, maio 2012.
- NATH, K. A.; KATUSIC, Z. S.; GLADWIN, M. T. The Perfusion Paradox and Vascular Instability in Sickle Cell Disease. *Microcirculation*, v. 11, n. 2, p. 179–193, 2004.
- NEVITT, S. J.; JONES, A. P.; HOWARD, J. Hydroxyurea (hydroxycarbamide) for sickle cell disease. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, v. 2017, n. 4, 20 abr. 2017.  
Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6478259/>>. Acesso em: 5 jan. 2020.
- NOLAN, V. G. *et al.* Hemolysis-associated priapism in sickle cell disease. *Blood*, v. 106, n. 9, p. 3264–3267, 1 nov. 2005.
- ORKIN, S. H.; BAUER, D. E. Emerging Genetic Therapy for Sickle Cell Disease. *Annual Review of Medicine*, 24 out. 2018.

ORKIN, S. H.; HIGGS, D. R. Sickle Cell Disease at 100 Years. *Science*, v. 329, n. 5989, p. 291–292, 16 jul. 2010.

PEGELOW, C. H. *et al.* Natural history of blood pressure in sickle cell disease: risks for stroke and death associated with relative hypertension in sickle cell anemia. *The American Journal of Medicine*, v. 102, n. 2, p. 171–177, fev. 1997.

PERES, L. A. B. *et al.* Biomarkers of acute kidney injury. *Brazilian Journal of Nephrology*, v. 35, n. 3, p. 229–236, set. 2013.

PINTO, V. M. *et al.* Sickle cell disease: a review for the internist. *Internal and Emergency Medicine*, v. 14, n. 7, p. 1051–1064, out. 2019.

POWARS, D. R. *et al.* Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. *Annals of Internal Medicine*, v. 115, n. 8, p. 614–620, 15 out. 1991.

REDDY, K. S. Global Burden of Disease Study 2015 provides GPS for global health 2030. *The Lancet*, v. 388, n. 10053, p. 1448–1449, 8 out. 2016.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 156, n. 4, p. 433–445, fev. 2012.

SARAF, S. L. *et al.* Genetic variants and cell-free hemoglobin processing in sickle cell nephropathy. *Haematologica*, v. 100, n. 10, p. 1275–1284, out. 2015.

SAÚDE. *Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Doença Falciforme*. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/22/Portaria-Conjunta-PCDT-Doenca-Falciforme.fev.2018.pdf>>. Acesso em: 05 jan 2020.

SAÚDE. *Lançada campanha para desmistificar a anemia falciforme*. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2012/11/lancada-campanha-para-desmistificar-a-anemia-falciforme>>. Acesso em: 05 jan 2020.

SERJEANT, G. R. One hundred years of sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 151, n. 5, p. 425–429, dez. 2010.

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

STEINBERG, M. H. Genetic etiologies for phenotypic diversity in sickle cell anemia. *TheScientificWorldJournal*, v. 9, p. 46–67, 18 jan. 2009.

SUNDARAM, N. *et al.* Biomarkers for early detection of sickle nephropathy. *American Journal of Hematology*, v. 86, n. 7, p. 559–566, jul. 2011.

SUNDD, P.; GLADWIN, M. T.; NOVELLI, E. M. Pathophysiology of Sickle Cell Disease. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, v. 14, n. 1, p. null, 2019.

TEWARI, S. *et al.* Environmental determinants of severity in sickle cell disease. *Haematologica*, v. 100, n. 9, p. 1108–1116, set. 2015.

TSARAS, G. *et al.* Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. *The American Journal of Medicine*, v. 122, n. 6, p. 507–512, jun. 2009.

VAIDYA, V. S.; FERGUSON, M. A.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers of Acute Kidney Injury. *Annual review of pharmacology and toxicology*, v. 48, p. 463–493, 2008.

VAN BEERS, EDUARD J. *et al.* Sickle cell patients are characterized by a reduced glyocalyx volume. *Haematologica*, v. 93, n. 2, p. 307–308, fev. 2008.

VILAS-BOAS, W. *et al.* Arginase levels and their association with Th17-related cytokines, soluble adhesion molecules (sICAM-1 and sVCAM-1) and hemolysis markers among steady-state sickle cell anemia patients. *Annals of Hematology*, v. 89, n. 9, p. 877–882, set. 2010.

WONG, T. E. *et al.* Evidence-Based Focused Review. *blood*, v. 8, n. 435768, p. 25287707, 2014.

ZAGO, M. A.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, p. 207–214, set. 2007.

## ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -  
HEMOCE



### PARECER CON SUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOZE DA FUNÇÃO RENAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME

**Pesquisador:** MARILIA ROCHA LAURENTINO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 03345918.5.3001.8152

**Instituição Proponente:** SECRETARIA DA SAUDE DO ESTADO DO CEARA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.229.549

#### Apresentação do Projeto:

A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (HbSS). Caracteriza-se pela elevada taxa de morbimortalidade devido à hemólise crônica, dano endotelial e frequentes episódios de vaso-oclusão, gerando danos a múltiplos órgãos. Alterações na função renal são frequentes na AF, sendo uma das morbidades mais frequentes principalmente na fase adulta. Novos biomarcadores da função renal estão sendo estudados, com o propósito de detectar precocemente alterações renais em portadores de AF, como molécula de lesão renal 1 (KIM-1), proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) e lipocaina associada à gelatinase de neutrófilos (N-GAL). Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico com pacientes adultos com diagnóstico molecular de AF, em acompanhamento ambulatorial no Hemoce e no HUWC.

#### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar novos biomarcadores de lesão renal precoce, associando-os com biomarcadores de hemólise e endoteliais em pacientes com Anemia falciforme.

#### avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: A coleta das amostras biológicas (coleta de sangue: faz parte da rotina clínica do paciente, porém apresenta risco de pequeno hematoma no braço) e perda de tempo com coleta de dados (informações).

**Endereço:** Av. José Bastos nº 3390 - Rodolfo Teófilo  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.431-086  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3101-2273 **E-mail:** drjoaomarcosmeneses@hotmail.com

CENTRO DE HEMATOLOGIA E  
HEMOTERAPIA DO CEARÁ -  
HEMOCE



Continuação do Parecer: 3.229.549

#### Benefícios:

O indivíduo participante da pesquisa poderá se beneficiar através da colaboração com a comunidade acadêmica, além do que os pacientes com AF poderão saber mais sobre a doença que possuem e ter a oportunidade de realizar exames novos que ainda não estão disponíveis em laboratórios, podendo contribuir no entendimento e melhora das manifestações clínicas da doença.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de Pesquisa já aprovado pelo CEP do HUWC conforme parecer anexado pelo pesquisador. O projeto em questão está bem escrito, de boa leitura e entendimento. Está incluído desenho do estudo, introdução, revisão, objetivos, metodologia, cronograma de atividades, orçamento e outros. A documentação exigida pela RESOLUÇÃO 466/2012/CNS/MS que regulamenta os estudos aplicados aos seres humanos foi incluída.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação do trabalho estão coerentes com o tema abordado e conforme os requisitos éticos em pesquisa.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto de pesquisa está devidamente instruído para que o mesmo seja executado. Portanto o parecer é favorável à sua APROVAÇÃO.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto de acordo com os preceitos éticos vigentes

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

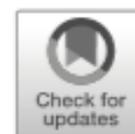
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	orcamentohemoce.pdf	17/11/2018 18:32:13	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito
Outros	filedepositariohemoce.pdf	17/11/2018 18:31:56	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito
Outros	encaminhamentohemoce.pdf	17/11/2018 18:31:28	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito
Outros	autorizacaohemoce.pdf	17/11/2018 18:31:06	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito
Outros	cartadeanuencia.pdf	17/11/2018 18:16:20	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito
Outros	cartaencaminhamentoaocep.pdf	17/11/2018 18:15:38	MARILIA ROCHA LAURENTINO	Aceito

**Endereço:** Av. José Bastos nº 3390 - Rodolfo Teófilo  
**Bairro:** RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.431-086  
**UF:** CE **Município:** FORTALEZA  
**Telefone:** (85)3101-2273 **E-mail:** drjoaomarcosmeneses@hotmail.com

## ANEXO B – ARTIGOS PUBLICADOS

Annals of Hematology  
<https://doi.org/10.1007/s00277-019-03813-9>

REVIEW ARTICLE



## Non-invasive urinary biomarkers of renal function in sickle cell disease: an overview

Marília Rocha Laurentino<sup>1</sup> · Sérgio Luiz Arruda Parente Filho<sup>2</sup> · Lívia Leal Chagas Parente<sup>3</sup> · Geraldo Bezerra da Silva Júnior<sup>4</sup> · Elizabeth De Francesco Daher<sup>2</sup> · Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes<sup>1</sup>

Received: 12 June 2019 / Accepted: 26 September 2019  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary condition characterized by homozygosis of the hemoglobin S (HbS) gene. Marked morbimortality is observed due to chronic hemolysis, endothelial injury, and episodes of vaso-occlusion, which leads to multi-organ damage. Renal impairment is common and may have different presentations, such as deficiency in urinary acidification or concentration, glomerulopathies, proteinuria, and hematuria, frequently resulting in end-stage renal disease (ESRD). Novel biomarkers of renal function, such as kidney injury molecule 1 (KIM-1), and neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) and monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) are being studied in order to enable early diagnosis of kidney damage in SCD.

**Keywords** Anemia, Sickle cell · Kidney diseases · Biomarkers

### Introduction

Sickle cell disease (SCD) is a common autosomal recessive hematological condition. Its mortality has risen 42% between 1990 and 2013, reaching 100,000 annual deaths worldwide [1]. Chronic hemolysis and repeated episodes of vaso-occlusion result in insidious damage of vital organs, among which the kidney is frequently affected. Sickle cell nephropathy (SCN) is considered one of the severest complications of SCD and may have its onset in childhood<sup>2</sup>. This review discusses SCD pathophysiology, treatment, clinical features, and

the mechanisms involved in kidney injury. Considering the burden of this issue, there is an interest in prevention and early detection of SCN and novel biomarkers are being studied for that purpose [2–10].

### Pathogenesis

Sickle cell disease (SCD) was first reported by Herrick in 1910, who described the characteristic shape of the erythrocytes. It is caused by a point mutation in chromosome 11p15.5, replacing thymine by adenine in the  $\beta$ -globin gene, which leads to an aminoacid change from a hydrophilic glutamic acid to a hydrophobic valine in the sixth position in the  $\beta$ -globin chain (Fig. 1). As a result, a mutated hemoglobin S (HbS) tetramer is formed and SCD occurs when homozygous mutation is present [11, 12].

### Pathophysiology

There are four main processes involved in SCD pathophysiology: HbS polymerization, vaso-occlusion, hemolysis associated with endothelial dysfunction, and inflammation [12].

Once glutamic acid is replaced by valine, HbS polymerization is favored in lower oxygen concentrations. HbS becomes

✉ Marília Rocha Laurentino  
[marilialaurentino@gmail.com](mailto:marilialaurentino@gmail.com)

<sup>1</sup> Post-Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, School of Pharmacy, Federal University of Ceará, Capitão Francisco Pedro, Street, n.1210 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza, Ceará CEP 60430-370, Brazil

<sup>2</sup> Medical Sciences Post-Graduation Program, Department of Internal Medicine, School of Medicine, Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>3</sup> School of Medicine, Christus University Center (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brazil

<sup>4</sup> Public Health Post-Graduation Program, School of Medicine, Health Sciences Center, University of Fortaleza, Fortaleza, Ceará, Brazil

# Clinical difference between identical twins with sickle cell anemia

## *Diferenças clínicas entre gêmeas idênticas com anemia falciforme*

Marília R. Laurentino<sup>1</sup>; Tarcisio Paulo Almeida Filho<sup>1</sup>; Pedro A. Maia Filho<sup>2</sup>; Francisco O. F. Nascimento<sup>2</sup>; Adlene F. Advincula<sup>2</sup>; Clarissa Maria G. Machado<sup>3</sup>; Romelia P. G. Lemes<sup>1</sup>

1. Universidade Federal do Ceará (UFC), Fortaleza, Ceará, Brazil. 2. Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará (Hemoce), Fortaleza, Ceará, Brazil. 3. Centro Universitário Christus (Unichristus), Fortaleza, Ceará, Brazil.

### ABSTRACT

Sickle cell anemia (SCA) is a genetic disease that causes important clinical manifestations due to chronic hemolysis and vascular occlusion. The aim of this study was to report a rare case of monozygotic twins diagnosed with SCA, presenting a different clinical characteristic. An interview with the patients was carried out and the medical records were consulted. One patient has a history of malleolar ulcer in the left back, while the other does not. Both patients used hydroxyurea at the same dosage. This study shows that SCA presents, in addition to genetic factors, non-genetic factors involved in the severity of the disease and its clinical manifestations. Studies are needed that may contribute to the understanding of the clinical heterogeneity of SCA.

**Key words:** sickle cell anemia; leg ulcer; monozygotic twins; genetics; hydroxyurea.

### RESUMO

*A anemia falciforme (AF) é uma doença genética que causa importantes manifestações clínicas devido à hemólise crônica e à oclusão vascular. O objetivo deste estudo foi relatar um caso raro de gêmeas univitelinas com diagnóstico de AF, apresentando uma característica clínica diferente. Uma entrevista com as pacientes foi realizada, e os prontuários foram consultados. Uma paciente tem história de úlcera maleolar na região esquerda, enquanto a outra não. Ambas as pacientes faziam tratamento com hidroxíureia na mesma dosagem. Este estudo mostra que a AF apresenta, além de fatores genéticos, fatores não genéticos envolvidos na gravidade da doença e suas manifestações clínicas, sendo necessários estudos que possam contribuir para o entendimento da heterogeneidade clínica da AF.*

**Unitermos:** anemia falciforme; úlcera da perna; gêmeos monozigóticos; genética; hidroxíureia.

### RESUMEN

*La anemia de células falciformes (ACF) es una enfermedad genética que causa importantes manifestaciones clínicas debido a la anemia hemolítica crónica y a la oclusión vascular. El objetivo de este estudio fue reportar un caso raro de gemelas monocigóticas con diagnóstico de ACF, presentando una característica clínica diferente. Se realizó una entrevista con las pacientes, consultándose sus fichas médicas. Una paciente tiene historia de úlcera maleolar en la región izquierda, mientras la otra no. Ambas hacían tratamiento con hidroxíurea en la misma dosis. Este estudio demuestra que la ACF presenta, además de factores genéticos, factores no genéticos involucrados en la severidad de la enfermedad y sus manifestaciones clínicas. Son necesarios estudios que contribuyan para la comprensión de la heterogeneidad clínica de la ACF.*

**Palabras clave:** anemia de células falciformes; úlcera de la pierna; gemelos monocigóticos; genética; hidroxíurea

## APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

**Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada “BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOCE DA FUNÇÃO RENAL EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME”. Você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar, para que todos os procedimentos desta pesquisa sejam esclarecidos.**

A pesquisa tem o objetivo principal de estudar novos exames que detectem alterações renais em pacientes com AF. A sua participação na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Para tanto, necessitamos que você autorize a obtenção de 2 (duas) amostras de sangue (4mL cada tubo) e uma amostra de urina (10mL) para que a pesquisa seja realizada. A participação na pesquisa não irá lhe expor a nenhum risco que possa comprometer a sua saúde, havendo apenas a possibilidade de formação de uma pequena mancha roxa devido à coleta do sangue. Você poderá se beneficiar em participar da pesquisa ao colaborar com a comunidade acadêmica, além de saber mais sobre a doença que possui e ter a oportunidade de realizar exames novos que ainda não estão disponíveis em laboratórios, podendo contribuir no entendimento e melhora das manifestações clínicas da sua doença.

Você poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O trabalho será executado segundo os princípios e normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 466/2012 e 441/2011.

Marilia Rocha Laurentino	
<b>Instituição:</b> Universidade Federal do Ceará	<u>Telefone para contato:</u>
<b>Endereço:</b> (85) 33668264/ (85)988420974	

**ATENÇÃO:** Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a sua participação na pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da UFC/PROPESQ – Rua Coronel Nunes de Melo, 1000 - Rodolfo Teófilo, telefone: 3366-8344. (Horário: 08:00-12:00 horas de segunda a sexta-feira) ou \_\_\_\_\_ O CEP é a \_\_\_\_\_ instância responsável pela avaliação e acompanhamento dos aspectos éticos de todas as pesquisas envolvendo seres humanos.

O abaixo assinado \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ anos, RG: \_\_\_\_\_, declara que é de livre e espontânea vontade que está como participante de uma pesquisa. Eu declaro que li cuidadosamente este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e que, após sua leitura, tive a oportunidade de fazer perguntas sobre o seu conteúdo, como também sobre a pesquisa, e recebi explicações que responderam por completo minhas dúvidas. E declaro, ainda, estar recebendo uma via assinada deste termo.

Nome do participante da pesquisa	Data	Assinatura
Nome do pesquisador	Data	Assinatura
Nome da testemunha	Data	Assinatura