



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LUAN REBOUÇAS CASTELO

**AVALIAÇÃO DO *STATUS* DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME: UMA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL
AGUDA**

FORTALEZA
2021

LUAN REBOUÇAS CASTELO

AVALIAÇÃO DO *STATUS* DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME: UMA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL
AGUDA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

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

FORTALEZA

2021

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)

- C345a Castelo, Luan Rebouças.
Avaliação do status da vitamina D em pacientes com anemia falciforme: uma associação com biomarcadores de lesão renal aguda / Luan Rebouças Castelo. – 2021.
35 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Ciências Biológicas, Fortaleza, 2021.
Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Anemia Falciforme. 2. Vitamina D. 3. Biomarcadores. 4. Lesão Renal Aguda. I. Título.
- CDD 570
-

LUAN REBOUÇAS CASTELO

AVALIAÇÃO DO *STATUS* DA VITAMINA D EM PACIENTES COM ANEMIA
FALCIFORME: UMA ASSOCIAÇÃO COM BIOMARCADORES DE LESÃO RENAL
AGUDA

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

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

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dr^a. Rosângela Pinheiro Gonçalves Machado
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A Minha família,

Aos meus amigos mais próximos.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha família, principalmente aos meus pais, por todo o esforço que fizeram para que eu pudesse trilhar meu caminho e chegar até aqui. Essa conquista acaba não sendo só minha, mas também de vocês.

Agradeço ao Marcos por todo o amor, respeito, companheirismo e diversão. Você conseguiu tornar meus dias mais leves e me ajudou de diversas formas por meio de nossas conversas e seus conselhos. Você é uma verdadeira fonte de inspiração.

Aos meus amigos do CPM que estão comigo desde 2009 e não conseguem sair da minha vida: Nala, Bitiz, Bia, Yanzinho, Xandy e Johnny. Vocês me entendem e me ajudam a me entender melhor, além de me proporcionar momentos mágicos a cada reencontro, especialmente a Nala! O agradecimento se estende ao Araújo, que insisto em perturbar desde a época que me buscava na parada do ônibus para ir ao colégio ou me esperava para voltarmos andando para casa.

À minha dupla mais que perfeita, Clayde e Lucas Paz, que também conheci no CPM alguns anos mais tarde: vocês são os amores da minha vida. É muito bom fazer parte de um trio tão diferente que se entende tão bem, principalmente sabendo que eu sou a razão no meio de vocês. Contem comigo para tudo, de verdade.

Aos *Biofriends*. Gigi, Laura, Mari, Keilla, Daniel e Ricael, foi um enorme prazer tê-los em minha turma durante todos esses anos. Vocês tornaram o curso bem mais agradável, principalmente durante aulas de campo em que eu insistia em contar histórias de terror e nos momentos pós-RU. Não importa o que já aconteceu entre a gente, sempre os levarei comigo. Devo a vocês muita admiração, fofocas e rolês, principalmente por sempre desaparecer. Amo muito cada um de vocês.

À *Formation*. Gabriel, Berenice, Nicolas, De Assis, Karol, Milena e Paulo. Obrigado por me aturarem durante três anos e meio nas aulas noturnas no IMPARH, vocês são guerreiros. Jamais esquecerei dos constrangimentos em sala de aula e até mesmo fora dela por causa de vocês. Com certeza sou reconhecido na avenida João Pessoa ou por vários motoristas de ônibus que nos levavam ao terminal da Parangaba, devido as vergonhas que vocês me faziam passar. Gabriel, embora você tenha diversas características que me fazem desgostar de alguém e seja o principal responsável por isso tudo que citei, continuarei cultivando nossa ótima amizade.

Aos amigos de laboratório e de campo, em especial Marcos, Mari, Alisson, Índira, Felipe, Mirian, Eva, Maiara e Cláudio. Ter trabalhado com vocês, ou pelo menos dividido

espaço, foi muito enriquecedor e me inspirou a ser um profissional íntegro e sério. Agradeço também aos professores Paulo Cascon e Kyria Nascimento, que me orientaram durante três longos anos da minha graduação.

À minha professora e orientadora, Romélia Pinheiro, por ter me guiado nessa tarefa árdua. Sempre entusiasmada com o trabalho, foi responsável por me fazer ultrapassar meus limites por meio de suas ideias, contribuições e atribuições que surgiram no meio do caminho. Já lhe admirava como profissional desde suas aulas ministradas em Hematologia Clínica. Aproveito para agradecer aos demais membros da banca, que contribuíram enormemente para a versão final desse trabalho que tanto me orgulho.

A todos os professores do curso de Ciências Biológicas. Vocês proporcionaram os meios que me fizeram chegar até aqui, muito obrigado.

À Associação Civil Jovens Pela Diferença, da qual faço parte com muito orgulho. Vocês surgiram na minha vida há pouco mais de um ano, no momento certo, e fizeram com que eu a enxergasse com mais luz. Poder manejar meu tempo e utilizá-lo em prol daqueles que precisam, principalmente crianças, foi algo me impactou. Por meio de pintura de rosto eu consegui me tornar uma pessoa melhor.

RESUMO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética hereditária, causada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina, levando à substituição de ácido glutâmico por valina formando a hemoglobina S (HbS). Em condições de hipóxia a HbS adquire a capacidade de se polimerizar, alterando a morfologia da hemácia para a forma de foice. Tal processo resulta na diminuição da sobrevivência da hemácia na circulação, desencadeando processos inflamatórios e fenômenos de vaso-oclusão. A hidroxiureia é o principal tratamento utilizado na AF, sendo responsável pelo aumento das concentrações de hemoglobina fetal, o que reduz a polimerização da HbS. A deficiência de vitamina D nesses indivíduos é uma condição nutricional comum que pode aumentar o risco de suas complicações, estando associada à lesão renal aguda. O rim é um dos órgãos mais afetados na AF e a nefropatia falciforme é uma de suas principais complicações. A progressão de lesões renais se dá principalmente pela ausência de detecção em seus estágios iniciais. Dessa forma, a avaliação de biomarcadores inovadores, como a molécula-1 de injúria renal (KIM-1) e a proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1), que possam diagnosticar precocemente lesões renais nesses indivíduos é extremamente necessária. Portanto, objetivou-se a associação entre os níveis séricos de vitamina D em pacientes com AF com biomarcadores de função renal. Participaram do estudo 51 pacientes adultos com AF que estiveram em acompanhamento no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC – no período de dezembro de 2017 a maio de 2018. O grupo controle foi composto por 17 indivíduos saudáveis doadores de sangue no mesmo período. Os níveis séricos de 25-hidroxi-vitamina D foram determinados por metodologia de imunoenensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA) e a função renal foi avaliada pelas dosagens de creatinina urinária, proteinúria, albuminúria, KIM-1 e MCP-1 obtidas a partir de amostras de urina recentes. Os níveis séricos de vitamina D estiveram abaixo do normal em cerca de 45% dos pacientes. Ainda, não houve associação entre os níveis de vitamina D com a gravidade da anemia, níveis de hemoglobina fetal e frequência de crises vaso-oclusivas. Sobre os biomarcadores de função renal, os níveis de proteinúria, albuminúria, KIM-1 e MCP-1 urinárias estiveram elevados nos pacientes em relação ao grupo controle. Por fim, os biomarcadores não convencionais KIM-1 e MCP-1 não estiveram associados com o *status* da vitamina D em pacientes com anemia falciforme, tornando seu uso inconclusivo na previsão de lesões renais.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Vitamina D. Biomarcadores. Lesão Renal Aguda.

ABSTRACT

Sickle cell disease (SCD) is a hereditary genetic disease caused by a point mutation in the sixth codon of the β -globin gene, leading to the replacement of glutamic acid by valine forming hemoglobin S (HbS). Under hypoxic conditions, HbS acquires the ability to polymerize, changing the red cell morphology to sickle shape. This process results in decreased red blood cell survival in the circulation, triggering inflammatory processes and vaso-occlusion phenomena. Hydroxyurea is the main treatment of SCD, being responsible for the increase in fetal hemoglobin, which reduces the polymerization of HbS. Vitamin D deficiency is a common nutrition condition among these individuals that increases the risk of its complications, and is associated with acute kidney injury. The kidney is very affected in SCD and sickle cell nephropathy is one of its main complications. The progression of kidney injuries is mainly due to the absence of detection in early stages. Thus, the evaluation of innovative biomarkers, such as the kidney injury molecule-1 (KIM-1) and the monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1), which can diagnose kidney injuries in these individuals early, is extremely necessary. Therefore, the aim of this study was to associate serum vitamin D levels among patients with SCD with biomarkers of renal function. The study included 51 adult patients with SCD who were being monitored at the Hematology Service of the Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC – from December 2017 to May 2018. The control group was composed of 17 healthy blood donors in the same period. Serum levels of 25-hydroxy-vitamin D were determined by chemiluminescent microparticle immunoassay (CMIA) and renal function was accessed by measurements of urinary creatinine, proteinuria, albuminuria, KIM-1 and MCP-1 obtained from recent urine samples. Serum vitamin D levels were low in 45% of patients. No association was found between vitamin D levels and the severity of anemia, fetal hemoglobin levels and the frequency of vaso-occlusive crises. Regarding renal function biomarkers, urinary proteinuria, albuminuria, KIM-1 and MCP-1 levels were elevated in patients compared to the control group. Finally, the unconventional biomarkers KIM-1 and MCP-1 were not associated with vitamin D status in patients with sickle cell anemia, making their use inconclusive in predicting kidney damage.

Keywords: Sickle cell disease. Vitamin D. Biomarkers. Acute Kidney Injury.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Fisiopatologia da nefropatia falciforme.....	16
Figura 2	- Níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	24
Figura 3	- Dosagem de creatinina sérica e ureia em pacientes com anemia falciforme..	25
Figura 4	- Níveis urinários de biomarcadores de lesão renal aguda em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	26
Figura 5	- Relação entre os níveis de KIM-1 e MCP-1 e vitamina D sérica em pacientes com anemia falciforme.....	26
Figura 6	- Sensibilidade e especificidade de biomarcadores urinários KIM-1 e MCP-1 em pacientes com anemia falciforme com deficiência de vitamina D.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas dos pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	23
Tabela 2 – Perfil hematológico os pacientes com anemia falciforme.....	23
Tabela 3 – Níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	24
Tabela 4 – Associação entre níveis séricos de vitamina D e gravidade de anemia, escore de hemoglobina fetal e quantidade de crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme.....	24
Tabela 5 – Dosagem de biomarcadores de lesão renal convencionais e inovadores em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1,25(OH) ₂ D	calcitriol
25(OH)D	25-Hidroxivitamina D
AF	Anemia falciforme
AUC	Área sob a curva
AVC	Acidente vascular cerebral
CMIA	Imunoensaio quimioluminescente de partículas
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
Hb	Hemoglobina
HbAA	Hemoglobina A
HbF	Hemoglobina fetal
HbS	Hemoglobina S
HbSS	Indivíduos com anemia falciforme
HEMOCE	Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
Ht	Hematócrito
HU	Hidroxiureia
HU HbSS	Indivíduos com anemia falciforme em tratamento com hidroxiureia
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
KIM-1	Molécula-1 de Injúria Renal
LACT	Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas
LPHGDH	Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas
LRA	Lesão renal aguda
MCP-1	Proteína-1 quimiotática de monócitos
N/A	Não aplicável
STA	Síndrome torácica aguda
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFG	Taxa de filtração glomerular
UFC	Universidade Federal do Ceará
UVB	Ultravioleta B

LISTA DE SÍMBOLOS

$\%$	Porcentagem
$<$	Menor que
\geq	Igual ou maior que
\leq	Igual ou menor que
®	Marca registrada
β	Beta
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo geral	18
2.2	Objetivo específico	18
3	MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1	Aspectos éticos	19
3.2	Local de estudo	19
3.3	Casuística	19
3.4	Critérios de seleção de amostra	20
3.4.1	<i>Critérios de inclusão</i>	20
3.4.2	<i>Critérios de exclusão</i>	20
3.5	Coleta de dados	20
3.6	Coleta de amostras	20
3.7	Dosagem de vitamina D	21
3.8	Avaliação da função renal	21
3.9	Análises estatísticas	22
4	RESULTADOS	23
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÃO	31
	REFERÊNCIAS	32

1 INTRODUÇÃO

A anemia falciforme (AF) é uma doença genética hereditária, causada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da β -globina. A substituição de adenina por timina resulta na substituição de ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia da β -globina, formando a hemoglobina S (HbS). Em condições de hipóxia a HbS adquire a capacidade de se polimerizar, tornando a membrana da hemácia mais rígida e alterando sua morfologia para a forma de foice, processo denominado de falcização (COSTA; CONRAN; FERTRIN, 2013).

Além da mudança conformacional, a polimerização da HbS e seu consequente enrijecimento da membrana celular resultam na diminuição da sobrevivência da hemácia na circulação. Ademais, provocam alterações na membrana eritrocitária com a exposição de moléculas da membrana celular e o aumento da adesão ao endotélio, desencadeando processos inflamatórios. Com isso, ocorre a diminuição do fluxo sanguíneo local, levando à vaso-oclusão e posterior isquemia (ZAGO; PINTO, 2007; REES; GIBSON, 2011; SUNDD; GLADWIN; NOVELLI, 2019).

As manifestações clínicas da AF são bastante heterogêneas, sendo ditadas principalmente pela rápida destruição dos eritrócitos e pela frequência das crises de vaso-oclusão. Os sintomas incluem, além de anemia hemolítica crônica e crises vaso-oclusivas, úlceras de perna, priapismo, acidente vascular cerebral (AVC), hipertensão pulmonar e síndrome torácica aguda (STA). Ainda, pacientes com AF podem desenvolver complicações esqueléticas, como a osteonecrose da cabeça femoral, e renais, como infecção de trato urinário, lesão renal aguda (LRA) e insuficiência renal crônica (BALLAS, 1991; ALEXANDER et al, 2004; ARDUINI; RODRIGUES; DE MARQUI, 2017; THEIN; IGBINEWEKA; THEIN, 2017).

A Hidroxiureia (HU) é o principal tratamento utilizado na AF, sendo responsável pela diminuição da morbimortalidade desses pacientes. Sua eficácia é determinada principalmente pelo aumento das concentrações de hemoglobina F (HbF), reduzindo a concentração da HbS, as frequências de crises vaso-oclusivas, duração de hospitalização e transfusão sanguínea. Além disso, alguns estudos associam o uso de HU com a melhora em parâmetros hematológicos, bem como com a diminuição de hemólise e inflamação (RODGERS et al, 1990; BRAWLEY et al, 2008; DONG; MCGANN, 2021).

A deficiência de vitamina D é comum entre crianças e adultos, estando relacionada principalmente com baixa densidade mineral óssea, chances aumentadas de fraturas, osteonecrose e osteoporose (HOLICK, 2007; MELAMED et al, 2008). Além disso,

essa condição nutricional tem sido associada com nefropatia, asma, doenças cardiovasculares e dor crônica. (FORREST; STUHLREHER, 2011; OSUNKWO *et al*, 2011)

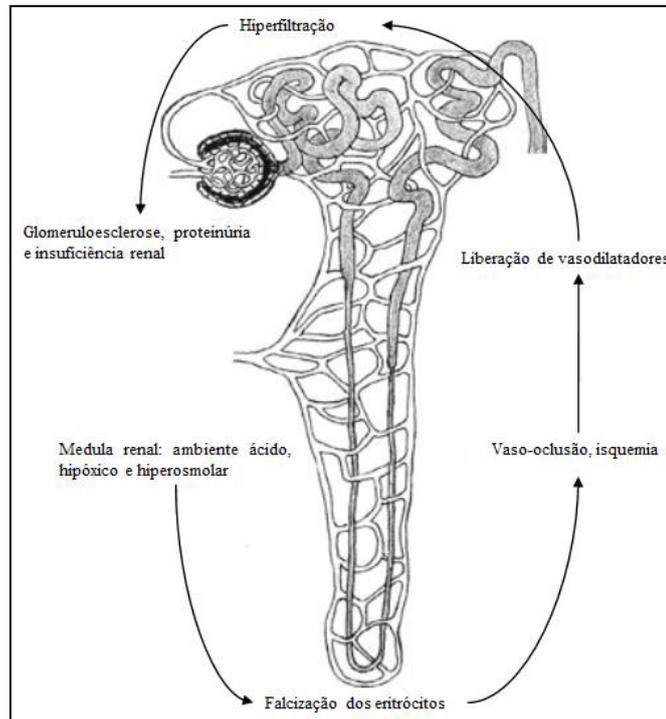
A síntese de vitamina D se inicia na pele, por meio da conversão de 7-desidrocolesterol em pré-vitamina D₃ e posterior isomerização em vitamina D₃. Esse processo é desencadeado pela exposição à radiação solar ultravioleta B (UVB). Ainda, a vitamina D₃ pode ser adquirida na alimentação e suplementação. Em seguida, ela sofre hidrólise no fígado, dando origem à sua forma inativa, 25-hidroxivitamina D₃ [25(OH)D]. Por fim, nos rins ocorrem a conversão para sua forma ativa, 1,25-dihidroxivitamina D [1,25(OH)₂D] ou calcitriol (ROSEN, 2011; BICKLE, 2014).

Apesar do calcitriol ser a forma ativa da vitamina D₃, sua concentração na circulação é bem menor que a da 25(OH)D. Dessa maneira, baixos níveis séricos de calcitriol não indicam necessariamente baixas concentrações de 25(OH)D. Portanto, este último é o melhor indicador do *status* de vitamina D, visto que reflete tanto o consumo da dieta, exposição à luz solar e conversão dos estoques de gordura no fígado (ROSEN, 2011).

A deficiência de vitamina D em indivíduos com AF é potencializada por exposição solar diminuída juntamente com a prevalência da etnia negra ou parda, má nutrição, diminuição de absorção intestinal e presença de lesões renais (ARLET *et al*, 2013). Portanto, nesses indivíduos, a deficiência de vitamina D é uma condição nutricional comum que está associada com o aumento de risco de suas complicações, estando inclusive associada à LRA (NOLAN *et al*, 2015).

O rim é um dos órgãos mais afetados na AF, com danos que se iniciam na infância e permanecem até a vida adulta (HAYMANN *et al*, 2010). O ambiente ácido, hipóxico e hiperosmolar da medula renal contribui para a desidratação dos eritrócitos e consequente aumento da polimerização e concentração da HbS. A falcização causa uma diminuição do fluxo sanguíneo no vaso reto descendente e promove a adesão dos eritrócitos ao endotélio, levando à oclusão e liberação de substâncias vasodilatadoras, como óxido nítrico e prostaglandinas, que por sua vez retornam ao glomérulo provocando um aumento na taxa de filtração. A persistência da hiperfiltração glomerular por sua vez causa danos renais e desenvolvimento de proteinúria, levando à glomeruloesclerose e posterior insuficiência renal (Figura 1) (SILVA JÚNIOR; LIBÓRIO; DAHER, 2011).

Figura 1. Fisiopatologia da nefropatia falciforme.



Fonte: Adaptado de Becker, 2011.

A nefropatia falciforme é uma das principais complicações renais da AF e engloba as alterações estruturais e funcionais dos rins, como anormalidades de volume, defeito de concentração (hipostenúria) e acidificação urinárias, hiperfiltração glomerular, proteinúria, hematuria e cicatriz cortical, fatores que podem eventualmente progredir para doença renal em estágio terminal (ALLON, 1990; ARONGUNDADE *et al*, 2011; BECKER, 2011; HARIRI *et al*, 2018).

A progressão da lesão renal na AF se dá principalmente pela ausência de detecção em seus estágios iniciais devido a sensibilidade e especificidade dos exames convencionais. A creatinina sérica, embora utilizada como padrão laboratorial para a detecção de lesão renal, é um biomarcador tardio, visto que sua concentração só aumenta após extenso dano glomerular, e pouco específico, visto que pode variar conforme idade, gênero, raça e peso, mesmo em pessoas saudáveis. Além dela, outros biomarcadores como albuminúria e proteinúria são utilizados na prática clínica para auxiliar no diagnóstico de LRA (PERES *et al*, 2013; ANDREUCCI *et al*, 2016).

A busca por biomarcadores não convencionais que possam detectar precocemente a LRA tem sido alvo de inúmeros estudos nos últimos anos. A molécula-1 de lesão renal (KIM-1) é uma proteína transmembrana expressa em células epiteliais tubulares desdiferenciadas após LRA isquêmica ou nefrotóxica, possui uma forma solúvel detectável na urina e sua expressão não ocorre em rins normais (HAN *et al*, 2002; LAURENTINO *et al*,

2019). A proteína-1 quimiotática de monócitos (MCP-1) é uma potente quimiocina produzida nos rins, expressa principalmente por células glomerulares e epiteliais tubulares em resposta à lesão por isquemia-reperfusão (PRODJOSUDJADI *et al*, 1995; PERES *et al*, 2013). Dessa maneira, essas duas proteínas apresentam características que as tornam potenciais biomarcadores de LRA, sobretudo em pacientes com AF.

Portanto, uma vez que a forma biologicamente ativa da vitamina D é processada nos rins e pacientes com anemia falciforme são frequentemente acometidos com deficiência dessa vitamina, além de complicações renais, a avaliação de biomarcadores convencionais e inovadores que possam diagnosticar precocemente lesões renais nesses indivíduos é extremamente necessária.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo associar os níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme com biomarcadores de função renal.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar a prevalência de alteração nos níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme;
- Avaliar a função renal em pacientes com anemia falciforme e relacionar com níveis séricos de vitamina D;
- Analisar a influência dos níveis séricos de vitamina D sobre a gravidade da anemia, o escore da hemoglobina fetal e a frequência de crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Aspectos Éticos

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

3.2. Local de Estudo

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

3.3. Casuística

Este é um estudo transversal, descritivo e analítico realizado no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – HUWC – no período de dezembro de 2017 a maio de 2018. Participaram da pesquisa 51 pacientes adultos com anemia falciforme, diagnosticados por eletroforese de hemoglobina e/ou cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Participaram do grupo controle 17 indivíduos adultos saudáveis (HbAA) que compareceram no HEMOCE para doar sangue durante o período do estudo. Ambos, pacientes e controles, foram pareados de acordo com idade e sexo.

Os pacientes com anemia falciforme foram estratificados:

- Em três grupos de acordo com os níveis de vitamina D: deficiência <20 ng/ml; insuficiência 20-29 ng/ml; e suficiência ≥ 30 ng/ml (HOLICK, 2007).
- Em dois grupos de acordo com a utilização de Hidroxiureia: uso contínuo há um ano ou mais; e interrupção de uso há mais de três meses.
- Em três grupos de acordo com os níveis de hemoglobina fetal: ≤ 5 ; >5 e ≤ 10 ; e $>10\%$ (SILVA; GONÇALVES; MARTINS, 2009).
- Em dois grupos de acordo com os níveis de hemoglobina (Hb): anemia leve a moderada ($Hb \geq 8g/dL$) e anemia grave ($Hb < 8g/dL$) (ABBAN *et al*, 2017).

- Em dois grupos com relação à quantidade de crises vaso-oclusivas: dor frequente (≥ 3 crises de dor intensa que exigiram cuidados no último ano) e dor não frequente (< 3 crises por ano) (DARBARI *et al*, 2012).

3.4. Critérios de Seleção da Amostra

3.4.1. Critérios de Inclusão

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

3.4.2. Critérios de Exclusão

- Pacientes que não apresentaram confirmação de anemia falciforme após análise em prontuário.
- Pacientes diagnosticadas com outros tipos de anemias.
- Pacientes gestantes.
- Pacientes acometidos com doença hepática ou doença renal crônica.
- Pacientes em uso de vitamina D.

3.5. Coleta de dados

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

3.6. Coleta de Amostras

Foi coletado 4mL de sangue periférico por punção venosa em um tubo com gel separador para a dosagem de vitamina D. Além disso, uma amostra de urina (10mL) foi

coletada para a quantificação dos biomarcadores de função renal, a saber: KIM-1, MCP-1, creatinina, proteína e albumina.

3.7. Dosagem de vitamina D

Os níveis séricos de 25-hidroxi-vitamina D foram determinados por metodologia de imunoensaio quimioluminescente de micropartículas (CMIA). Nesse método, a amostra passa por um pré-tratamento com adição de soluções para romper a ligação entre 25(OH)D e sua proteína ligante. Em seguida, adiciona-se um anticorpo monoclonal marcado e um análogo de vitamina D, ocorrendo então conjugação em excesso nos domínios de ligação do anticorpo. Por fim, são adicionados reagentes ácidos e básicos, iniciando uma reação quimioluminescente que é inversamente proporcional às concentrações de 25(OH)D na amostra (ONG *et al*, 2012).

3.8. Avaliação da função renal

A função renal dos pacientes foi avaliada a partir das dosagens de creatinina urinária, proteinúria, albuminúria, KIM-1 e MCP-1 obtidas a partir de amostras de urina recentes.

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

Proteinúria: Determinada pelo método Vermelho de pirogalol (Sensiprot - Labtest®) e analisada por espectrofotometria. Os resultados foram normalizados pela creatinina urinária e expressos em mg/dL-Cr.

Albuminúria: Determinada pelo método de imunoturbidimetria automatizada (Cobas C 111, Roche®). Os resultados obtidos foram normalizados pela creatinina urinária e expressos em mg/dL-Cr.

KIM-1 e MCP-1: Quantificadas por técnica de imunoensaio ligado à enzima (ELISA) sanduíche, na qual utilizaram-se kits comerciais fornecidos pelos fabricantes. Nesse método, o anticorpo de um antígeno é adsorvido em placa contendo 96 poços. Em seguida, o biomarcador presente na amostra de urina é adicionado e se liga ao anticorpo. A adição de um segundo anticorpo conjugado com uma enzima gera uma reação calorimétrica e sua intensidade será proporcional à quantidade de antígenos presentes. Por fim, a análise de reação é feita por espectrofotometria. Os resultados das concentrações foram

normalizados pela creatinina urinária da mesma amostra e expressos em pg/mL-Cr (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2000).

3.9. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa *IBM-SPSS v22*. Os resultados foram expressos como mediana (intervalo interquartil). O teste *t-Student* de amostras independentes, a análise de variância de Welch (ANOVA de Welch) e teste não paramétrico de *Kruskall-Wallis* foram realizados para comparar as diferenças entre grupos. Foi realizada uma curva ROC para avaliar a sensibilidade e a especificidade dos marcadores KIM-1 e MCP-1, na qual os pacientes foram dicotomizados e classificados entre suficientes (vitamina D de 30 a 100 ng/mL) e insuficientes (vitamina D < 30 ng/mL). O teste exato de Fisher foi realizado para avaliar a associação dos níveis de vitamina D com os níveis de Hb; frequência de crises vaso-oclusivas e o uso de HU. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Os pacientes com AF apresentaram, em média, idade de $32,59 \pm 1,40$ anos e o grupo controle $28,65 \pm 2,41$ anos. Dentre os pacientes, 60% eram do sexo feminino e cerca de 66% estavam em tratamento com HU há mais de um ano (Tabela 1).

Tabela 1. Características demográficas dos pacientes com anemia falciforme e grupo controle.

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

HU: Hidroxiureia; N/A: Não aplicável. Os valores foram representados como média ± desvio padrão e frequência (%)

Fonte: Elaborado pelo autor

Do total, 11 pacientes apresentaram anemia grave. Os níveis de hemoglobina, hematócrito e HbF estiveram elevados, enquanto a contagem de leucócitos e plaquetas estiveram diminuídas nos pacientes em uso de HU em relação aos que não estavam utilizando o medicamento. Entretanto, as diferenças não foram estatisticamente significantes (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil hematológico dos pacientes com anemia falciforme.

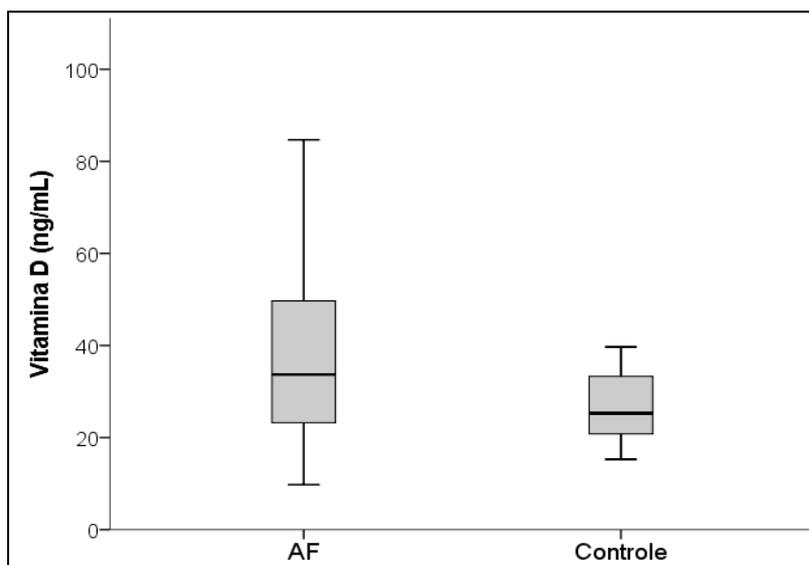
	Total (n=51)	HbSS (n=17)	HU HbSS (n=34)	valor de p
Hb (g/dL)	9,17 ± 1,5	8,9 ± 1,56	9,13 ± 1,55	0,373
Anemia leve a moderada, n (%)	40 (78,4%)	13 (76,5%)	27 (79,4%)	N/A
Anemia grave, n (%)	11 (21,6%)	4 (23,5%)	7 (20,6%)	N/A
Ht (%)	26,52 ± 4,4	25,82 ± 4,74	26,88 ± 4,36	0,431
Leucócitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	10 ± 3,2	11,6 ± 3,3	9,2 ± 2,9	0,011
Plaquetas ($\times 10^5/\text{mm}^3$)	3,59 ± 1,2	4,05 ± 1,3	3,3 ± 1	0,05
HbF (%)	13,2 ± 5,6	12,2 ± 7	13,8 ± 4,8	0,347

Hb: Hemoglobina; Ht: Hematócrito; HbF: Hemoglobina Fetal; N/A: Não aplicável. Os valores foram representados como média ± desvio padrão e frequência (%).

Fonte: Elaborado pelo autor

Os níveis séricos de vitamina D nos pacientes foram, em mediana, 33,7 ng/mL (23,35 - 49,7), enquanto no grupo controle 25,3 ng/mL (20,8 - 33,3) (Figura 2). Ainda, a deficiência de vitamina D foi constatada em 7 pacientes (13,72%), enquanto a insuficiência em 16 (31,37%) e suficiência em 28 (54,91%) (Tabela 3).

Figura 2. Níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.



AF: pacientes com anemia falciforme.

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 3. Níveis séricos de vitamina D em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.

	AF (n=51)	Controle (n= 17)	valor de p
Vitamina D (ng/mL)	37,98 ± 19,11	26,91 ± 7,66	0,001
Deficiência, n (%)	7 (13,7%)	3 (17,6%)	0,277
Insuficiência, n (%)	16 (31,4%)	7 (41,2%)	0,862
Normal, n (%)	28 (54,9%)	7 (41,2%)	0,003

AF: pacientes com anemia falciforme. Os valores foram representados como média ± desvio padrão e frequência (%).

Fonte: Elaborado pelo autor

O teste exato de Fisher mostrou que não houve associação entre os níveis séricos de vitamina D e a gravidade de anemia ($\chi^2_{(2)} = 2,568$; $p = 0,253$). Resultados semelhantes foram observados entre os níveis de vitamina D e o escore de HbF ($\chi^2_{(2)} = 2,172$; $p = 0,667$) e entre os níveis de vitamina D e o número de crises vaso-oclusivas ($\chi^2_{(2)} = 2,812$; $p = 0,288$) (Tabela 4).

Tabela 4. Associação entre níveis séricos de vitamina D e gravidade de anemia, escore de hemoglobina fetal e frequência de crises vaso-oclusivas em pacientes com anemia falciforme.

Anemia	Vitamina D			Total
	Suficiente	Insuficiente	Deficiente	
Leve / Moderada	22	14	4	40
Grave	6	2	3	11
Total	28	16	7	51
Hemoglobina Fetal				
≤5%	1	1	0	2
>5 e ≤10	10	3	3	16
>10	17	12	4	33
Total	28	16	7	51

Tabela 4. Continuação

Crises vaso-oclusivas	Vitamina D			Total
	Suficiente	Insuficiente	Deficiente	
Dor frequente	6	5	0	11
Dor não frequente	22	11	7	40
Total	28	16	7	51

Fonte: Elaborado pelo autor

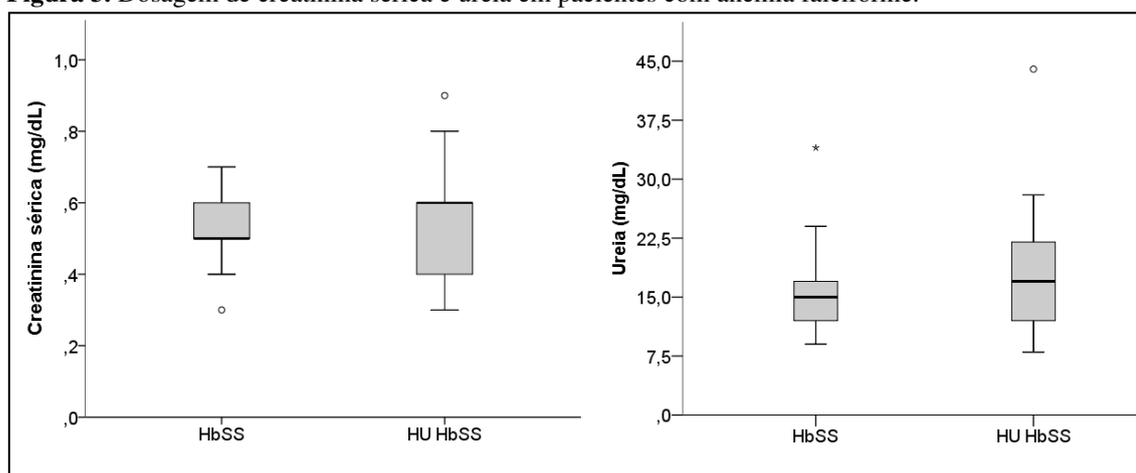
Os níveis séricos de creatinina e ureia dos pacientes foram, em mediana, de 0,5mg/dL (0,45 - 0,6) e 17 mg/dL (12 - 21), respectivamente (Tabela 5). Não houve influência da utilização de HU sobre os níveis de creatinina sérica [HbSS: 0,5 mg/dL (0,5 - 0,6); HU HbSS: 0,6 (0,42 - 0,6); $p = 0,473$]. Resultados semelhantes foram observados para a ureia [HbSS: 15 mg/dL (12 - 21); HU HbSS: 17 (12,7 - 22); $p = 0,417$] (Figura 3).

Tabela 5. Dosagem de biomarcadores de lesão renal convencionais e inovadores em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.

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

TFGe: Taxa de filtração glomerular; N/A: não aplicável. Os resultados estão expressos em média ± desvio padrão.

Fonte: Elaborado pelo autor

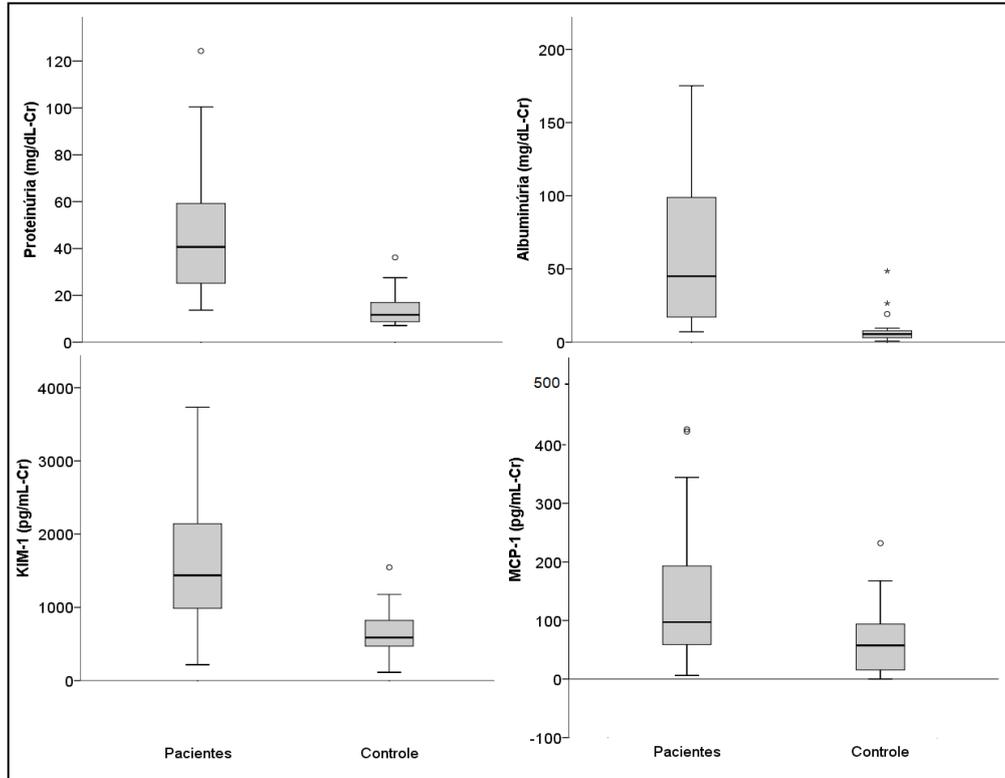
Figura 3. Dosagem de creatinina sérica e ureia em pacientes com anemia falciforme.

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

A proteinúria foi maior nos pacientes em comparação ao grupo controle [pacientes: 40,63 mg/dL-Cr (25,19 - 59,23); controle: 11,68 (8,77 - 16,96); $p < 0,001$]. Resultados semelhantes foram observados para albuminúria [pacientes: 46,27 mg/dL-Cr (19,01 - 111,24); controle: 5,5 (3 - 7,7); $p = 0,001$], KIM-1 [pacientes: 1437,37 pg/dL-Cr

(986,51 - 2142,02); controle: 588,38 (469,77 - 821,46); $p < 0,001$] e MCP-1 [pacientes: 97,14 pg/dL-Cr (58,98 - 193,13); controle: 57,39 (15,58 - 93,72); $p = 0,004$] (Figura 4).

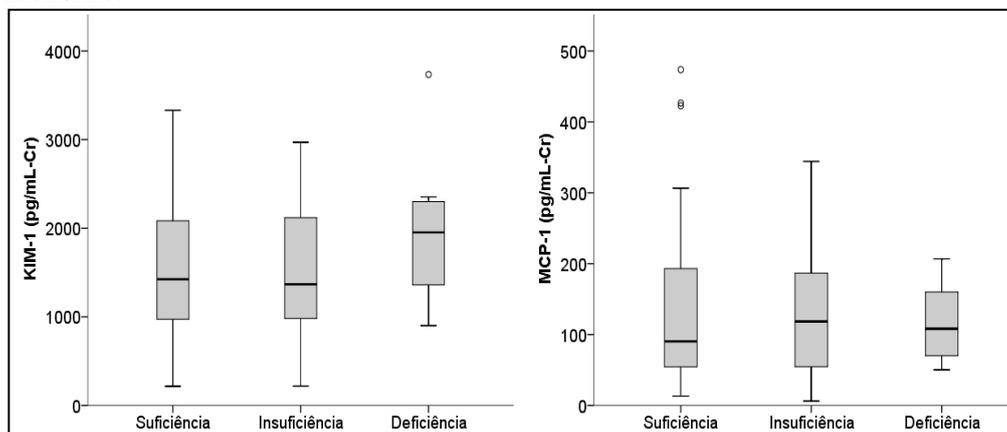
Figura 4. Níveis urinários de biomarcadores de lesão renal aguda em pacientes com anemia falciforme e grupo controle.



Fonte: Elaborado pelo autor

A ANOVA de Welch mostrou que, embora os pacientes com deficiência de vitamina D tenham apresentado níveis maiores de KIM-1 urinário, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados com pacientes com insuficiência e suficiência ($F_{(2,15,41)} = 0,776$; $p > 0,05$). O teste não-paramétrico de *Kruskall-Wallis* mostrou que não há associação entre os níveis urinários de MCP-1 e o *status* da vitamina D em pacientes com anemia falciforme ($\chi^2_{(2)} = 0,895$; $p > 0,05$) (Figura 5).

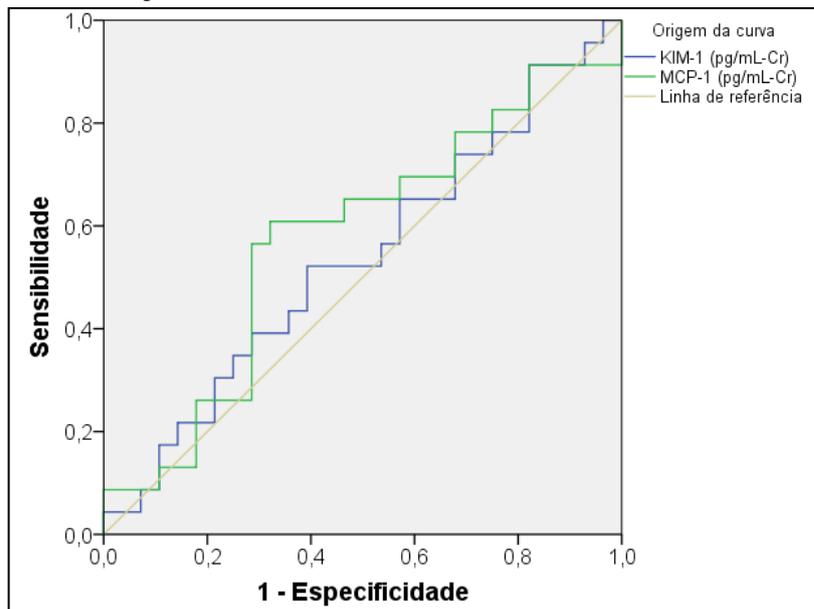
Figura 5. Relação entre os níveis de KIM-1 e MCP-1 com vitamina D sérica em pacientes com anemia falciforme.



Fonte: Elaborado pelo autor

Foi realizada uma curva ROC para avaliar a sensibilidade e a especificidade dos biomarcadores KIM-1 e MCP-1 em relação aos níveis séricos de vitamina D nos pacientes. Em ambos os casos os resultados não se mostraram estatisticamente significantes, sendo para KIM-1, AUC = 0,536; EP 0,082; $p > 0,05$; e para MCP-1, a AUC= 0,576; EP 0,083; $p > 0,05$. Portanto, não houve relação entre baixos níveis séricos de vitamina D e a probabilidade de desenvolvimento de doença renal (Figura 6).

Figura 6. Sensibilidade e especificidade dos biomarcadores urinários KIM-1 e MCP-1 em pacientes com anemia falciforme com deficiência de vitamina D.



Fonte: Elaborado pelo autor

5 DISCUSSÃO

No presente estudo os pacientes com anemia falciforme apresentaram níveis séricos de vitamina D superiores aos reportados na literatura. Na Arábia Saudita, os pacientes em crise álgica em relação aqueles em curso estável da doença apresentaram medianas de 10,1 ng/mL e 15,7 ng/mL, respectivamente. Embora o país tenha uma alta taxa de incidência solar durante o ano, questões culturais como as vestimentas podem ter contribuído para os baixos níveis de 25(OH)D na população, composto em sua maioria pelo sexo feminino (ALJAMA *et al*, 2018). Nos Estados Unidos, um grupo de 142 pacientes adultos de centros médicos acadêmicos localizados em Norfolk e Illinois apresentaram, em mediana, 7 ng/mL e 11,5 ng/mL de 25(OH)D, respectivamente. Os níveis inferiores foram atribuídos ao estado de saúde dos pacientes, às temperaturas mais altas e ao uso de protetor solar, visto que a região era localizada próximo a *resorts* (GOODMAN *et al*, 2010).

A vitamina D pode ser dosada por diferentes métodos apresentando, portanto, uma variação na precisão e acurácia, fatores que dificultam a sua comparação entre estudos (ALVES *et al*, 2013). Embora os imunoenaios sejam amplamente utilizados na prática clínica devido a sua simplicidade e baixo custo, os resultados podem variar devido a especificidade do anticorpo utilizado (ARTEF, 2018). Downing e colaboradores (2017) demonstraram em seu estudo que CMIA pode superestimar os níveis de 25(OH)D devido a reação cruzada com 24R,25(OH)₂D₃. Dessa forma, acredita-se que os valores medianos de vitamina D sérica no presente estudo tenham sido superestimados devido a técnica utilizada.

O presente estudo teve como objetivo avaliar a prevalência de deficiência de vitamina D em pacientes com anemia falciforme. Embora tenha sido baixa, seu valor esteve de acordo com a variação apresentada na literatura, a qual atinge valores de até 96% (NOLAN *et al*, 2015). O uso de diferentes definições para essa condição contribui para essa variação e dificulta as comparações entre populações distintas. Em um estudo de coorte com 56 adultos, Arlet e colaboradores (2013) reportaram a prevalência de deficiência de vitamina D de 75% utilizando como ponto de corte 10 ng/mL. Estudos que utilizaram a definição de deficiência de vitamina D como concentrações inferiores a 20ng/mL apresentaram prevalências de 64% (HASSAN *et al*, 2013), 65% (HAN *et al*, 2019) e 85% (LEE; LICURSI; MCMAHON, 2015), bem superiores ao reportado no presente estudo. Entretanto, a baixa prevalência dessa condição já era esperada, visto que aos valores em mediana de vitamina D foram superiores a 30ng/mL, considerado normal no padrão estabelecido.

Os níveis séricos de vitamina D não estiveram associados com a gravidade da anemia, corroborando com os resultados obtidos por Winters e colaboradores (2014) em

pacientes pediátricos e adultos. Alguns estudos demonstraram uma associação entre níveis aumentados de HbF com melhora de prognóstico em pacientes com anemia falciforme, como diminuição de produtos de estresse oxidativo, crises vaso-oclusivas e úlceras de perna (SILVA; GONÇALVES; MARTINS, 2009; ELIAS *et al*, 2012). Entretanto, no presente estudo não foi possível constatar uma associação entre HbF e níveis séricos de vitamina D.

Não houve associação entre os níveis séricos de vitamina D e a frequência de crises vaso-oclusivas. Entretanto, a deficiência de vitamina D já foi positivamente correlacionada com a quantidade de crises vaso-oclusivas em alguns trabalhos (LEE; LICURSI; MCMAHON, 2015; HAMDI *et al*, 2018; MCCASKILL *et al*, 2018). Dessa forma, no presente estudo tal associação não foi determinada provavelmente pela baixa prevalência dessa condição nutricional na amostra estudada.

Os níveis séricos de creatinina e ureia não foram influenciados pelo uso de HU. A disfunção renal em indivíduos com anemia falciforme provoca distúrbios na concentração urinária, com consequências refletidas no aumento das concentrações de creatinina sérica e ureia (AL-NAAMA; AL-SADOON; AL-SADOON, 2000). Os níveis de creatinina são altamente influenciados pela massa muscular e TFG e sua hipersecreção resulta na superestimação deste último. Portanto, uma vez que indivíduos com AF normalmente possuem hiperfiltração glomerular, os níveis de creatinina sérica tendem a ser menores, além de serem reduzidos por sua hipersecreção (MAGALHÃES, 2007).

A albuminúria foi mais evidente nos pacientes em relação ao grupo controle. Na anemia falciforme, ela é a principal manifestação clínica de lesão glomerular, sendo detectada antes do aumento dos níveis de creatinina e sua prevalência aumenta conforme a idade (ATAGA; DEREBAİL; ARCHER, 2014; AL-MUSAWA; AL-SAQULADI, 2019). Estudos com pacientes pediátricos reportaram a prevalência de albuminúria variando entre 11,3 e 47,5% (SOLARIN; NJOKANMA; KEHINDE, 2014; GHOBRIAL *et al*, 2016). Entretanto, no presente estudo demonstrou-se uma prevalência de 56,8%, corroborando com os resultados de Guasch e colaboradores (2006), no qual a albuminúria esteve presente em 62% dos adultos com anemia falciforme.

Na amostra estudada, a proteinúria foi mais evidente nos pacientes em comparação ao grupo controle. Embora menos prevalente que a albuminúria, a proteinúria também é uma manifestação precoce na nefropatia falciforme, podendo progredir para síndrome nefrótica e doença renal de estágio terminal (ALKHUNAIZI; AL-KHATTI, 2014; SULAIMAN *et al*, 2020). Ainda, sua detecção é um fator de risco preditor de insuficiência

renal, a qual está relacionada ao aumento da mortalidade em indivíduos com anemia falciforme (POWARS *et al*, 1991).

Os níveis de KIM-1 urinário estiveram elevados nos pacientes em relação ao grupo controle. Sua utilidade como um possível biomarcador de LRA foi avaliada em pacientes com insuficiência renal, nos quais os níveis elevados de KIM-1 foram associados com a necessidade de diálise ou morte hospitalar e com nível de gravidade de LRA (LIANGOS *et al*, 2007). Ainda, em pacientes com anemia falciforme os níveis de KIM-1 se apresentaram elevados, estando associados com albuminúria e hemoglobina na urina, revelando-se um potencial biomarcador precoce de lesão renal nesses indivíduos (SUNDARAM *et al*, 2011; HAMIDEH *et al*, 2014; SARAF *et al*, 2015). Embora o presente estudo tenha contribuído no que diz respeito aos elevados níveis de KIM-1 em indivíduos com anemia falciforme, possíveis associações com biomarcadores convencionais de LRA não foram avaliadas.

No presente estudo, os níveis urinários de MCP-1 estiveram elevados nos pacientes em relação ao grupo controle, corroborando com os resultados de dos Santos e colaboradores (2015). Em pacientes com doenças associadas a inflamação glomerular, a MCP-1 urinária esteve elevada, havendo também correlação com proteinúria, um marcador de lesão glomerular (ROVIN *et al*, 1996). Na anemia falciforme, níveis elevados de MCP-1 urinária foram reportados em crianças com albuminúria, um indicativo que a medição dessa proteína pode ser realizada precocemente nesses pacientes (BELISARIO *et al*, 2020). Embora haja estudos que indiquem a eficácia de MCP-1 como indicador de lesões glomerulares, estudos longitudinais ainda se fazem necessários para avaliar sua potencialidade como um biomarcador de LRA.

Ao avaliar a relação entre os biomarcadores não convencionais KIM-1 e MCP-1 com o *status* da vitamina D em pacientes com anemia falciforme foi verificado que, embora seus níveis estivessem elevados no grupo deficiente e insuficiente, respectivamente, não houve diferença significativa em relação aos outros grupos. Ainda, as áreas sob a curva não alcançaram valores de 0,75, um indicador de boa atividade como biomarcador (NGUYEN; DEVARAJAN, 2008). Portanto, no presente estudo o uso de KIM-1 e MCP-1 não foi conclusivo na previsão de lesões renais em pacientes com anemia falciforme deficientes de vitamina D. A baixa prevalência de deficiência de vitamina D na amostra pode ter sido fator determinante nessa observação. Dessa forma, novos estudos envolvendo uma maior quantidade de pacientes com AF e com maior prevalência dessa condição nutricional podem auxiliar na elucidação sobre o uso desses biomarcadores como preditores de lesão renal.

6 CONCLUSÃO

Os níveis séricos de vitamina D estiveram abaixo do normal em cerca de 45% dos pacientes com anemia falciforme. Ainda, não houve associação entre os níveis de vitamina D com a gravidade da anemia, níveis de hemoglobina fetal e frequência de crises vaso-oclusivas. Sobre os biomarcadores de função renal, os níveis de proteinúria, albuminúria, KIM-1 e MCP-1 urinárias estiveram elevados nos pacientes com anemia falciforme em relação ao grupo controle. Por fim, os biomarcadores não convencionais KIM-1 e MCP-1 não estiveram associados com o *status* da vitamina D em pacientes com anemia falciforme, tornando seu uso inconclusivo na previsão de lesões renais.

REFERÊNCIAS

- ABBAN, 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, 2017.
- ALEXANDER, N. *et al.* Are there clinical phenotypes of homozygous sickle cell disease? **British Journal of Haematology**, v. 126, p. 606-611, 2004.
- ALJAMA, A. *et al.* Vitamin D deficiency in sickle cell disease patients in Eastern Province of Saudi Arabia. **Ann. Saudi Med.** v. 38, n.2, p. 130 – 136, 2018.
- ALKHUNAIZI, A.M., AL-KHATTI, A.A. Proteinuria in patients with sickle cell disease. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.** v. 25, n. 5, p. 1038 – 1041, 2014.
- ALLON, M. Renal abnormalities in sickle cell disease. **Arch. Intern. Med.** v. 150, p. 501 – 504, Mar, 1990.
- AL-MUSAWA, F. E.; AL-SAQLADI, A-W. M. Prevalence and correlates of microalbuminuria in Yemeni children with sickle cell disease. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.** v. 30, n. 4, p. 832 – 842, 2019.
- AL-NAAMA, L.M., AL-SADOON, E.A., AL-SADOON, T.A. Levels of acid uric, urea and creatinine in Iraqi children with sickle cell disease. **J. Park. Med. Assoc.** v. 50, n. 3, 5p. 2000.
- ALVES, M. *et al.* Vitamina D: importância da avaliação laboratorial. **Rev. Port. Endocrinol. Diabetes Metabol.** v. 8, n.1, p. 32 – 39, 2013.
- ANDREUCCI, M. *et al.* The ischemic/nephrotoxic acute kidney injury and the use of renal biomarkers in clinical practice. **European Journal of Internal Medicine.** v. 39, p.1-8, 2016.
- ARDUINI G.A.O.; RODRIGUES, L.P.; DE MARQUI, A.B.T.; Mortality by sickle cell disease in Brazil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 39, n. 1, p. 52-56, 2017.
- ARLET, J.-B. *et al.* Relationship between vitamin D deficiency and bone fragility in sickle cell disease: A cohort of 56 adults. **Bone.** v. 52, p. 206-211, 2013.
- ARONGUNDADE, F.A. *et al.* An appraisal of kidney dysfunction and its risk factors in patients with sickle cell disease. **Nephron. Clin. Pract.** v. 118, p. 225-231, 2011.
- ARTEF, S.H. Vitamin D assays in clinical laboratory: past, present and future challenges. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology.** v. 175, p. 136 – 137, 2018.
- ATAGA, K.I.; DEREBAİL, V.K.; ARCHER, D.R. The glomerulopathy of sickle cell disease. **American Journal of Hematology.** v. 89, n. 9, p. 907 – 914, 2014.
- BALLAS, S.K. Sickle cell anemia with few painful crises is characterized by decreased red blood cell deformability and increased number of dense cells. **Am. J. Hematol.**, v. 36, p. 122-130, 1991.

BALLAS, S.K. More definitions in sickle cell disease: Steady state v base line data. **Am. J. Hematol.**, 87 (3). p. 338, 2011.

BECKER, A.M. Sickle cell nephropathy: challenging the conventional wisdom. **Pediatr. Nephrol.** v. 26, p. 2099-2109, 2011.

BELISARIO, A.R. *et al.* Evidence for interactions between inflammatory markers and renin-angiotensin system molecules in the occurrence of albuminuria in children with sickle cell anemia. **Cytokine.** v. 125, <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2019.154800>.

BICKLE, D.D. Vitamin D metabolism, mechanism of action, and clinical applications. **Chem. Biol.** v. 21, n. 3, p. 319-329, Mar, 2014.

BRAWLEY, O.W. *et al.* National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Hydroxyurea Treatment for Sickle Cell Disease. **Annals of Internal Medicine.** v. 148, n. 12, p. 932-940, 2008.

COSTA, F.F.; CONRAN, N.; FERTRIN, K.Y. Anemia Falciforme. *In*: ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Tratado de Hematologia.** São Paulo: Atheneu, 2013. p. 205 – 223.

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, 2012.

DONG, M.; MCGANN, P.T. Changing the clinical paradigm of hydroxyurea treatment for sickle cell anemia through precision medicine. **Clinical Pharmacology & Therapeutics.** v. 109, n. 1, p. 73-81, 2021.

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

DOWNLING, K.G. *et al.* Improved accuracy of a tandem liquid chromatography-mass spectrometry method measuring 24R,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-dihydroxyvitamin D metabolites in serum using unspiked controls and its application to determining cross-reactivity of a chemiluminescent microparticle assay. **Journal of Chromatography A.** v. 1497, p. 102 – 109, 2017.

ELIAS, D.B.D. *et al.* Correlation of low levels of nitrite and high levels of fetal hemoglobin in patients with sickle cell disease at baseline. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 24, n.4, p. 265 – 269, 2012.

FORREST, K.Y.Z.; STUHLREHER, W.L. Prevalence and correlates of vitamin D deficiency in US adults. **Nutrition Research.** v. 31, p. 48-54, 2011.

GHOBRAL, E.E. *et al.* Urinary transforming growth factor β -1 as a marker of renal dysfunction in sickle cell disease. **Pediatrics and Neonatology.** v. 57, p. 174 – 180, 2016.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A. **Immunology**. 4th ed. New York: W. H. Freeman and Company. 2000.

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

GUASCH, A. *et al.* Glomerular involvement in adults with sickle cell hemoglobinopathies: prevalence and clinical correlates of progressive renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 17, p. 2228 – 2235, 2006.

HAMDI, M. *et al.* Vitamin D and nonskeletal complications among Egyptian sickle cell disease patients. **Advances in Hematology**. v. 2018, 7 pp, 2018.

HAMIDEH, D. *et al.* Albuminuria correlates with hemolysis and NAG and KIM-1 in patients with sickle cell anemia. **Pediatr. Nephrol.** v. 29, p. 1997 – 2003, 2014.

HAN, J. *et al.* Risk factors for vitamin D deficiency in sickle cell disease. **British Journal of Haematology**. v. 181, n. 6, p. 828 – 835, 2019.

HAN, W. K. *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): A novel biomarker for human renal proximal tubule injury. **Kidney International**. v. 62, p. 237 – 244, 2002.

HARIRI, E. *et al.* Sickle cell nephropathy: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. **International Urology and Nephropathy**. v. 50, p. 1075-1083, 2018.

HASSAN, A.B. *et al.* Prevalence of vitamin D deficiency in patients with sickle cell disease in Bahrain. **International Journal of Medicine**. v. 1, n. 2, p. 23 – 28, 2013.

HAYMAN, J.-P. *et al.* Glomerular hyperfiltration in adults with sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.** v. 5, p. 756-761, 2010.

HOLICK, M. F. Vitamin D Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 357, p. 266-281, 2007.

LAURENTINO, M.R. *et al.* Non-invasive urinary biomarkers of renal function in sickle cell disease: an overview. **Annals of Hematology**. v. 98, p. 2653-2660, 2019.

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

LIANGOS, O. *et al.* Urinary N-Acetyl- β -(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. **J. Am. Soc. Nephrol.** v. 18, p. 904 – 912, 2007.

MAGALHÃES, I.Q. Alterações renais nas doenças falciformes. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v.29, n.3, p. 279 – 284, 2007.

MCCASKILL, M. L. *et al.* Serum 25-hydroxyvitamin D and diet mediates vaso-occlusive related hospitalizations in sickle-cell disease patients. **Nutrients**. v. 10, 15pp, 2018.

MELAMED, M. L. *et al.* 25-hydroxyl Vitamin D Levels and the Risk of Mortality in the General Population. **Archives of Internal Medicine**, v.168, n.15, p. 1629-1637, 2008.

NGUYEN, M.T.; DEVARAJAN, P. Biomarkers for early detection of acute kidney injury. **Pediatr. Nephrol.** v. 23, p. 2151 – 2157, 2008.

NOLAN, V.G. *et al.* Prevalence of Vitamin D deficiency in Sickle cell disease: A systematic review. **Plos One.** v.10, n.3, 12p., Mar, 2015.

ONG, L. *et al.* Current 25-hydroxyvitamin D assays: Do they pass the test? **Clinica Chimica Acta.** v. 413, p. 1127 – 1134, 2012.

OSUNKWO, I. *et al.* Vitamin D deficiency and chronic pain in sickle cell disease. **British Journal of Haematology.** v. 153, p. 538-540, 2011.

PERES, L.A.B. *et al.* Biomarcadores da injúria renal aguda. **J. Bras. Nefrol.** v. 35, n.3, p. 229-236, 2013.

POWARS, D.R. *et al.* Chronic renal failure in sickle cell disease: Risk factor, clinical course and mortality. **Annals of Internal Medicine.** v. 115, p. 614 – 620, 1991.

PRODJOSUDJADI, W. *et al.* Production and cytokine-mediated regulation of monocyte chemoattractant proteina-1 by human proximal tubular epithelial cells. **Kidney International.** v. 48, p. 1477 – 1486, 1995.

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

RODGERS, G.P. *et al.* Hematologic responses of patients with sickle cell disease to treatment with hydroxyurea. **The New England Journal of Medicine.** v. 332, n. 15, p: 1037-1045, 1990.

ROSEN, C.J. Vitamin D Insufficiency. **The New England Journal of Medicine.** v. 364, n. 3, p. 248-254, Jan, 2011.

ROVIN, B.H. *et al.* Glomerular expression of monocyte chemoattractant protein-1 in experimental and human glomerulonephritis. **Lab. Invest.** v. 71, p. 536 – 542, 1996.

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

SILVA, L.B.; GONÇALVES, R.P.; MARTINS, M.F. Estudo da correlação entre os níveis de hemoglobina fetal e o prognóstico dos pacientes com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 31, n. 6, p. 417 – 420, 2009.

SILVA JÚNIOR, G.B.; LIBÓRIO, A.B.; DAHER, E.F. New insights on pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sickle cell nephropathy. **Ann. Hematol.** v. 90, p. 1371- 1379, 2011.

SOLARIN, A.U.; NJOKANMA, F.O.; KEHINDE, O. Prevalence and clinical correlates of microalbuminuria among children with sickle cell anaemia attending Lagos state University Teaching Hospital, Ikeja. **Afr. J. Paed. Nephrol.** v.1, p. 37 – 45, 2014.

SULAIMAN, M.M. *et al.* Proteinuric and nonproteinuric chronic kidney disease among patients with sickle cell anaemia (HbSS) attending a tertiary hospital in north-eastern Nigeria. **Hematol. Oncol. Stem Cell Ther.** <https://doi.org/10.1016/j>.

SUNDARAM, N. *et al.* Biomarkers for early detection of sickle nephropathy. **Am. J. Hematol.** v. 86, p. 599 – 566, 2011.

SUNDD, P.; GLADWIN, M.T.; NOVELLI, E.M. Pathophysiology of sickle cell disease. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v.14, p. 263-292, 2019.

THEIN, M.S.; IGBINWEKA, N.E.; THEIN, S.L. Sickle cell disease in the older adult. **Pathology**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2017.

WINTERS, A.C. *et al.* Vitamin D insufficiency is a frequent finding in pediatric and adult patients with sickle cell disease and correlates with marker of cell turnover. **J. Nutr. Disorders Ther.** v. 4, n. 2, 5p. 2014.

ZAGO, M.A.; PINTO, A.N.S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Ver. Bras. Hematol. Hemoter**, v.29, n.3, p. 207-214, 2007.