



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

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

USO DA PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS-1 COMO BIOMARCADOR DE
LESÃO RENAL PRECOCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

FORTALEZA

2014

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

USO DA PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS-1 COMO BIOMARCADOR DE
LESÃO RENAL PRECOCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Ceará para apreciação do
Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

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

FORTALEZA

2014

]

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

S239u

Santos, Talyta Ellen de Jesus dos.

Uso da proteína quimiotática de monócitos-1 como biomarcador de lesão renal precoce em pacientes com anemia falciforme / Talyta Ellen de Jesus dos Santos. – 2014.
53 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2014.

Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.

1. Anemia Falciforme. 2. Biomarcadores Farmacológicos. 3. Rim. 4. Quimiocina CCL2. 5. Óxido Nítrico. 6. Malondialdeído. 7. Hidroxiuréia. I. Título.

CDD 616.1527

TALYTA ELLEN DE JESUS DOS SANTOS

USO DA PROTEÍNA QUIMIOTÁTICA DE MONÓCITOS-1 COMO BIOMARCADOR DE
LESÃO RENAL PRECOCE EM PACIENTES COM ANEMIA FALCIFORME.

Dissertação submetida à Coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de Concentração: Farmácia Clínica.

Aprovada em: 17/02/ 2014

BANCA EXAMINADORA

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

Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Elizabeth De Francesco Daher
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Aos pacientes com anemia falciforme, que prontamente aceitaram participar deste e de vários outros estudos desenvolvidos por nosso grupo. Sem eles, não haveria resultados, discussão; enfim, não haveria este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, em primeiro lugar, ao meu Senhor Jesus Cristo, o qual é a minha razão de viver e que me dá a esperança necessária para realizar todos os meus objetivos, como essa tese.

Agradeço aos meus pais que me proveram exemplo de vida, família, e que desde cedo me ensinaram os valores espirituais e éticos cristãos. Que me consolaram quando precisei, cuidaram quando adoeci, alegraram-se quando venci. Por terem me cercado de carinho, cuidado, disciplina, e me preparado para agora seguir meus passos, dando continuidade a nossa bela família.

Agradeço aos meus amigos da faculdade, pessoas maravilhosas, que aprendi a amar, cada um com sua personalidade singular. Juntos, aprendemos, ensinamos, rimos e choramos; tivemos vontade de desistir, nos motivamos, e hoje estamos aqui, concluindo mais um desafio proposto.

A minha querida amiga e orientadora professora Romélia, que desde quando eu era apenas uma graduanda, me recebeu amavelmente como monitora, e, desde então, desenvolvemos uma amizade sincera e uma parceria de ensino-aprendizado mútuo. Mesmo cobrando artigos, resultados e relatórios não consegue deixar de nos cativar com sua simpatia, cuidado e histórias bem humoradas. Muito obrigada professora! Se Deus quiser estaremos mais quatro anos aprimorando nossos conhecimentos e nossa amizade.

Aos amados irmãos da igreja Ágape que, mesmo sem entender bem o tema, sempre estavam em oração por mim, em cada momento importante da minha vida acadêmica. Que o Senhor conserve esse amor e essa união.

Por último, mas não menos importante, ao meu amado noivo, que me incentiva a ser alguém melhor e, constantemente, a buscar conhecimento. Alguém que me compreendeu durante esse tempo estressante, me apoiou e conseguiu fazer aparecer sorrisos no meu rosto, quando a vontade era de chorar ou de desistir. Não apenas me ajudou emocionalmente, mas se aventurou a conhecer o meu ambiente de trabalho, meu campo de estudo, contribuiu para a correção do português e hoje até arrisca em falar sobre o Bantu/Bantu. Muito obrigada, meu amor. Que o Senhor nos ajude a cultivar esse sentimento sempre.

RESUMO

Novos biomarcadores da função renal estão sendo estudados com o propósito de detectar precocemente alterações renais em portadores de AF, dentre eles encontra-se a proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), uma quimiocina de monócitos e macrófagos, produzida por células do sistema renal em resposta ao processo de isquemia-reperfusão.

OBJETIVO: Avaliar o uso de MCP-1 como biomarcador de lesão renal precoce em pacientes adultos com anemia falciforme em uso ou não de hidroxiureia (HU).

METODOLOGIA: Participaram do estudo 50 pacientes: 30 em uso de (HU)-grupo SSHU e 20 sem HU-grupo SS. Um grupo controle foi composto por 20 indivíduos com HbAA, sem complicações renais. Proteinúria, albuminúria, creatinina e uréia urinárias, marcadores do estresse oxidativo como MDA e NOx foram determinados por métodos espectrofotométricos. MCP-1 urinário foi detectado por enzima imunoensaio (ELISA). Os dados clínicos e de hemograma, creatinina e ureia séricas foram retirados do prontuário médico. Foi coletada a primeira urina do dia. O programa Graph Pad Prism 5.0 foi utilizado para análise estatística.

A comparação das médias entre os grupos foi realizada através do teste t de Student e análise de variância (ANOVA). **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** Albumina urinária esteve maior nos pacientes em relação ao grupo controle (Controle- 3.12 ± 4.35 ; SSHU- 11.85 ± 9.16 ; SS- 14.13 ± 12.22 ; $p < 0.0001$). A taxa de filtração glomerular estimada apresentou-se significativamente menor no grupo controle (Controle- 95.9 ± 19.92 ; SSHU- 137.9 ± 40.7 e SS- 140.1 ± 53.9 ; $p = 0.0024$). Observaram-se níveis elevados de MCP-1 (Controle- 42.12 ± 27.6 ; grupo SSHU- 166.2 ± 88.37 e grupo SS- 219.7 ± 115.0 ; $p < 0.001$; $p = 0.039$); MDA (Controle- 2.29 ± 1.13 ; grupo SSHU- 5.25 ± 2.33 e grupo SS- 6.93 ± 2.12 ; $p < 0.0001$; $p = 0.006$) e NO^x (Controle- 2.25 ± 1.9 ; grupo SSHU- 56.54 ± 9.15 e grupo SS 39.12 ± 9.02 ; $p < 0.0001$; $p = 0.001$) nos pacientes em comparação aos controles saudáveis, e mais elevados no grupo SS em relação ao grupo SSHU. Os pacientes com haplótipo Bantu/Bantu apresentaram maior concentração de MCP-1, independente do uso de HU, seguido de Bantu/ Benin e Benin/Benin ($p = 0.01$). Observou-se correlação positiva entre os uma correlação entre os níveis de MCP-1 e contagem de monócitos ($p = 0.004$; $r = 0.42$); proteinúria ($p = 0.002$; $r = 0.43$); albuminúria ($p = 0.0004$; $r = 0.47$); TFG ($p = 0.02$; $r = 0.32$); MDA ($p = 0.02$; $r = 0.32$) e NO^x ($p = 0.007$; $r = 0.38$). **CONCLUSÃO:** Os resultados indicam que MCP-1 foi preditivo na detecção de alteração renal, e que pode estar correlacionado ao dano causado pelo estresse oxidativo nos rins, evidenciado pelos altos níveis de MDA. Ainda, a HU parece ter reduzido o dano renal, visto que os pacientes em uso do fármaco apresentaram níveis reduzidos desses parâmetros.

Palavras-chave: Anemia Falciforme. Biomarcadores Farmacológicos. Rim. Quimiocina CCL2. Óxido Nítrico. Malondialdeído. Hidroxiuréia.

ABSTRACT

New biomarkers of renal function are being studied for the purpose of early detection of alterations in patients with renal AF, among them is a monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), a chemokine monocyte and macrophage cells produced by the system kidney in response to ischemia-reperfusion process. **OBJECTIVE:** To evaluate the use of MCP-1 as a biomarker for early kidney damage in adult patients with sickle cell anemia in use or not of hydroxyurea (HU). **METHODS:** The study included 50 patients: 30 in use (HU) group and 20 SSHU without HU - SS group. A control group consisted of 20 individuals with HbAA without renal complications. Proteinuria, albuminuria, creatinine and urinary urea, oxidative stress markers such as MDA and NO_x were determined by spectrophotometric methods. Urinary MCP-1 was detected by enzyme immunoassay (ELISA). Clinical data and blood count, serum creatinine and urea were taken from medical records. The first urine of the day was collected. The Graph Pad Prism 5.0 software was used for statistical analysis. The comparison of means between groups was performed using Student's t analysis of variance (ANOVA) and . **RESULTS:** All urinary parameters. Albuminuria was higher in patients than in the control group (Control - 3.12 ± 4.35 ; SSHU - 11.85 ± 9.16 , 14.13 ± 12.22 - SS, $p < 0.0001$). The estimated glomerular filtration rate presented significantly lower in the control group (95.9 ± 19.92 - Control; SSHU 137.9 ± 40.7 , and 140.1 ± 53.9 - SS, $p = 0.0024$). (We observed high levels of MCP-1 (Control 42.12 ± 27.6 , $166.2 \pm$ - group SSHU 88.37 and 219.7 ± 115.0 SS - group, $p < 0.001$, $p = 0.039$), MDA (Control 2.29 ± 1.13 ; SSHU group 5.25 ± 2.33 and SS group 6.93 ± 2.12 , $p < 0.0001$, $p = 0.006$) and NO_x (control 2.25 ± 1.9 ; SSHU group 39.12 ± 09.02 and SS group 56.54 ± 09.15 , $p < 0.0001$, $p = 0.001$) in patients compared to healthy controls, and higher in the SS group compared to the group SSHU. Patients with Bantu / Bantu had higher concentration of MCP-1, independent of the use of HU, followed by Bantu / Benin and Benin / Benin ($p = 0.01$). There was a positive correlation between a correlation between the levels of MCP-1 and monocyte count ($p = 0.004$, $r = 0.2$); proteinuria ($p = 0.002$, $r = 0.43$), albuminuria ($p = 0.0004$, $r = 0.47$); GFR ($p = 0.02$, $r = 0.32$), MDA ($p = 0.02$, $r = 0.32$) and NO_x ($p = 0.007$, $r = 0.38$). **CONCLUSION:** The results show that MCP-1 was predictive in detecting renal disorder, which may be correlated to damage caused by oxidative stressors kidney evidenced by the high levels of MDA. Further, HU appears to have reduced renal damage, as the patients taking the drug showed reduced levels of these parameters.

Keywords: Sickle Cell Anemia. Pharmacological Biomarkers. Kidney. Chemokine CCL2. Nitric Oxide. Malondialdehyde. Hydroxyurea.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1	Moléculas de hemoglobina S polimerizadas, após desoxigenação, levando à falcização dos eritrócitos.	13
2	Produção de óxido nítrico em células musculares lisas	15
3	Detecção de MCP-1 urinária e sua implicação em doenças renais humanas.	23
4	Amostragem do estudo	28
5	Fluxograma de coleta de amostras biológica	29
6	Etapas da dosagem de MCP-1 urinário.	32
7	Gráfico 1: Níveis de MCP-1 urinária nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20), SSHU (n=30); SS (n=20)	34
8	Gráfico 2: Níveis de MDA urinário nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20), SSHU (n=30); SS (n=20)	35
9	Gráfico 3: Níveis de NO ^x plasmático nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20), SSHU (n=30); SS (n=20)	36
10	Gráfico 4: Diferença entre as dosagens de MCP-1 segundo os principais haplótipos da globina β^S .	36
11	Correlação entre concentrações de MCP-1 e os parâmetros contagem de monócitos, proteinúria, albuminúria	37
12	Correlação entre concentrações de MCP-1 e taxa de filtração glomerular (TFG), MDA urinário e NO ^x plasmático	37

LISTA DE TABELAS

- | | | |
|---|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 | Dados clínicos e laboratoriais dos grupos controle (n=20), SSHU (N=30) e SS (n=50). | 33 |
| 2 | Avaliação da função renal dos grupos controle (n=20), SSHU (n=30) e SS (n=50). | 34 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AF	Anemia Falciforme
NO	xido Nítrico
EDTA	cido Etilenodiaminotetracético
Hb S	Hemoglobina S
O ₂ ⁻	íon superóxido
OH ⁻	Radical hidroxila
MDA	Malonaldeído
HU	Hidroxiura
Hb F	Hemoglobina fetal
Hb SS	Homozigose da hemoglobina S
GC	Guanilato ciclase
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
Hb A	Hemoglobina normal
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Meta Hb S	Meta Hemoglobina S
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrognio
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
TBARS	Substâncias tiobarbitricas ácido reativas
LHDGH	Laboratório de hemoglobina e doenças genéticas hematológicas
HEMOCE	Hemocentro do Estado do Ceará
ET-1	Endotelina 1
OH-1	Heme-oxidase 1
TFGe	Taxa de filtração glomerular estimada- inglês- Egfr
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
NF-κβ	Fator Nuclear kappa beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Anemia Falciforme.....	12
1.2	Fisiopatologia da Anemia Falciforme.....	13
1.3	Alterações Renais na AF.....	17
1.4	Marcadores de Função Renal.....	19
1.5	MCP-1 como marcador de função renal.....	21
1.6	MCP-1 na Anemia Falciforme.....	23
1.7	O papel da Hidroxiuréia	24
2	OBJETIVOS.....	26
2.1	Objetivo geral.....	26
2.2	Objetivos específicos.....	26
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	27
3.1	Desenho do estudo.....	27
3.2	Seleção da Amostra.....	27
3.2.1	Critérios de inclusão.....	27
3.2.2	Critérios de exclusão.....	27
3.3	Locais do estudo.....	28
3.4	Amostragem.....	28
3.4.1	Coleta de dados	28
3.4.2	Coleta de amostra biológica.....	29
3.5	Testes Laboratoriais.....	29
3.5.1	Sumário de urina.....	29
3.5.2	Dosagem do Malonaldeído.....	30
3.5.3	Dosagem do Nitrito.....	30
3.5.4	Creatinina urinária.....	30
3.5.5	Proteinúria.....	31
3.5.6	Microalbuminúria.....	31
3.5.7	MCP-1/CCL2.....	31
3.6	Aspectos legais e éticos.....	32
3.7	Análise estatística.....	32
4	RESULTADOS.....	33
5	DISCUSSÃO.....	38
6	CONCLUSÃO.....	42
	REFERÊNCIAS.....	43
	APÊNDICE A - Ficha para coleta de dados.....	52
	APÊNDICE B - Termo de consentimento livre e esclarecido.....	53
	ANEXO A - Aceite do comitê de ética.....	55

1 INTRODUÇÃO

1.1 Anemia falciforme

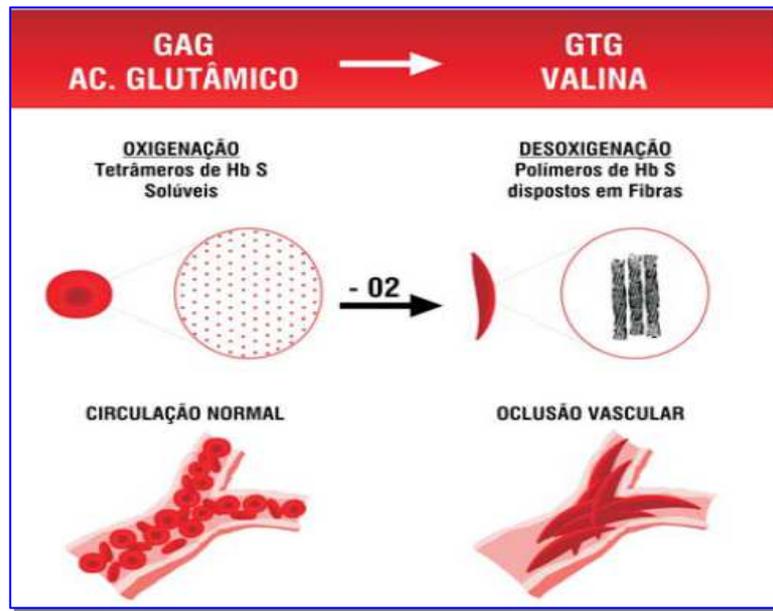
A anemia falciforme (AF) é uma doença hereditária que resulta de uma mutação pontual (GAG→GTG) no códon do gene da β -globina, conduzindo a uma substituição de ácido glutâmico por valina na sexta posição da cadeia polipeptídica, sendo caracterizada pela homozigose da hemoglobina S (HbS) (ZAGO; PINTO, 2007).

Os eritrócitos falciformes foram observados pela primeira vez em 1910 por James Herrick, médico de Chicago em 1910, que as denominou de células em “foice” no sangue de um estudante de medicina negro, portador de um grave quadro anêmico acompanhado de icterícia, complicações pulmonar e de úlceras de membros inferiores. Em 1927, Hahn e Gillespie demonstraram a dependência do fenômeno de falcização com a tensão de oxigênio, atribuindo o defeito à hemoglobina, e não somente ao glóbulo vermelho (NAOUM, 1997).

Ham e Castle (1936) apresentaram a hipótese da ocorrência de um “ciclo vicioso de estase eritrocitária” nas células falcizadas do sangue periférico, provocando aumento na viscosidade sanguínea e do fluxo sanguíneo através dos capilares e diminuição da tensão do oxigênio, provocando mais falcização (NAOUM, 1997).

Pauling e colaboradores (1949) observaram uma lenta taxa de migração na eletroforese, que correspondia à hemoglobina dos pacientes com anemia falciforme, enquanto os pais destes pacientes apresentavam tanto a hemoglobina normal quanto a anormal. Ingram em 1957 elucidou a natureza bioquímica da doença: a substituição do ácido glutâmico por valina no sexto aminoácido da globina beta. Esta descoberta estabeleceu que a substituição de um único aminoácido em uma cadeia polipeptídica pode alterar a função do produto gênico de maneira suficiente a produzir variados efeitos clínicos (Figura 1) (BEUTLER, 1988).

Figura 1: Moléculas de hemoglobina S polimerizadas, após desoxigenação, levando à falcização dos eritrócitos.



Fonte: LOBO *et al.*, 2007.

A anemia falciforme é uma doença originada na África e a presença desta anemia nas Américas se deve à imigração de descendentes daquelas regiões. Quanto à etnia, a AF é característica dos negros, no entanto devido à intensa miscigenação no nosso país isso não ocorre (LEE *et al.*, 1999).

No Brasil, acredita-se que existam dois milhões de portadores do gene da HbS (SILVA; SHIMAUTI, 2006). Apesar de ser uma doença prevalente na população negra, devido ao elevado grau de miscigenação em nosso país, apresenta uma tendência a atingir parcela cada vez mais significativa da população. De fato, estudos populacionais têm demonstrado a crescente presença de hemoglobina S em indivíduos caucasoides (BANDEIRA, 2007).

Distribui-se heterogeneamente, sendo mais frequente nos estados Norte e Nordeste. Estima-se que cerca de 4% da população brasileira e 6% a 10% dos afrodescendentes são portadores do traço falciforme (Hb AS) e que, anualmente, nascem aproximadamente 3 mil crianças portadoras de doença falciforme (DF), número este que corresponde ao nascimento de uma criança doente para cada mil recém-nascidos vivos. Atualmente, estima-se que tenhamos 20 a 30 mil brasileiros portadores da doença falciforme (CANÇADO, 2009).

1.2 Fisiopatologia da AF

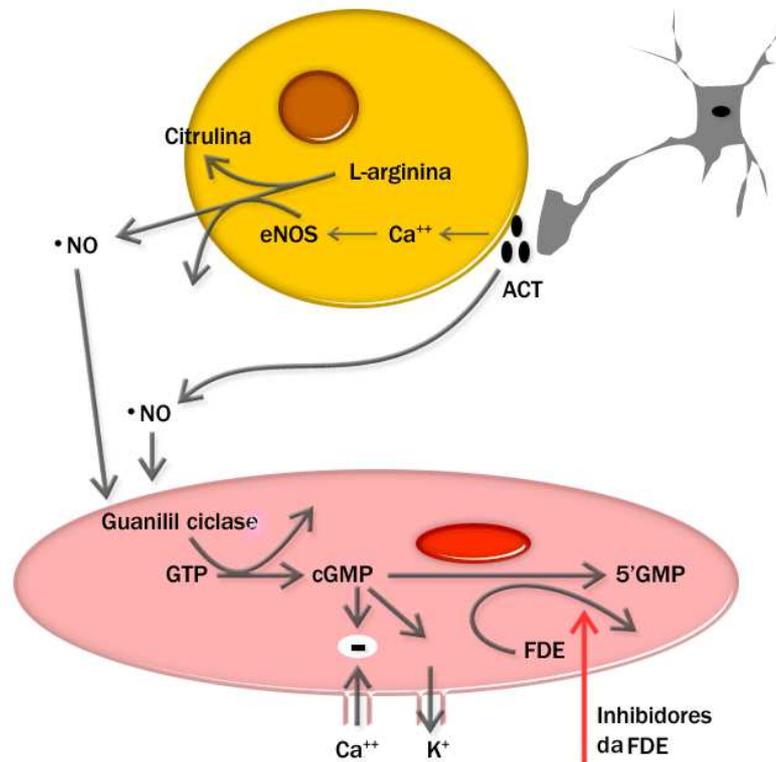
Os pacientes com AF apresentam quadro clínico heterogêneo com variado grau de gravidade das manifestações, além de sofrerem influência de fatores como: idade, sexo, genéticos, hematológicos e ambientais (GALIZA NETO *et al.*, 2005).

O principal evento responsável por todas as complicações da anemia falciforme é a polimerização da HbS desoxigenada. Os polímeros alongados danificam os glóbulos vermelhos, aumentando a viscosidade do citoplasma, induzindo a liberação de cátions através da membrana, o que promove a desidratação e aumento da expressão de moléculas de adesão. Essas mudanças levam as células vermelhas a obstruir e lesionar os vasos sanguíneos. A vaso-oclusão provoca isquemia de tecidos, resultando em mais uma cascata de eventos patológicos, incluindo a hemólise, a disfunção endotelial, a inflamação, hipercoagulabilidade, estresse oxidativo, lesão de reperfusão e hipoxemia (ELIAS *et al.*, 2010).

Os mecanismos envolvidos na vaso-oclusão são complexos e envolvem, dentre outros processos, a redução da biodisponibilidade de óxido nítrico (NO), com consequente elevação do tônus vasomotor, interações entre reticulócitos, adesão endotelial, ativação leucocitária e plaquetária (CANALLI *et al.*, 2008).

O óxido nítrico (NO) é um potente vasodilatador que regula o tônus vascular. Formado a partir da L-arginina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (eNOS), que se encontra no endotélio e região perivascular de vasos sanguíneos. Sua produção é sensível a fatores hemodinâmicos (tensão de cisalhamento) e a mecanismos mediados por receptores (bradicinina, serotonina, adenosina, ADP / ATP, histamina, trombina). O NO se difunde nas células musculares lisas vasculares ativando a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC), presente nas células musculares lisas, que catalisa a formação de mais de 3', 5'-cíclico monofosfato de guanosina (cGMP). O GMPc sinaliza o sequestro de Ca^{2+} intracelular, causando assim, relaxamento (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

Figura 2: Produção do óxido nítrico em células musculares lisas.



Fonte: Disponível em: www.antioxidante.com

A regulação vascular mediada por NO pode ser exemplificada no rim, onde o endotélio do aparelho justaglomerular produz NO e participa da modulação na secreção de renina. A ação parácrina do NO, derivada da atividade de NOS, tem sido considerada como a principal fonte de NO que induz vasodilatação na microvasculatura (LANCASTER, 1994).

A redução da biodisponibilidade do NO pode ser justificada por três mecanismos: pela reação da hemoglobina livre com o NO disponível, formando metehemoglobina e nitrato inativo; pela liberação de arginase, enzima que degrada L-arginina, precursora do NO e formação de radicais livres, que também consomem o NO disponível. Assim, na anemia falciforme, pode-se evidenciar um estado de resistência ao NO (ROTHER *et al.*, 2005).

A HbS é muito menos solúvel que a hemoglobina normal (HbA) quando desoxigenada e polimeriza-se em fibras rígidas que provocam deformação do eritrócito, assim como a rigidez, e oclusão da microcirculação. Além disso, a HbS é menos estável que a HbA quando oxigenada e, portanto, sofre oxidação em uma velocidade muito rápida, produzindo altas concentrações de espécies reativas de oxigênio dentro do eritrócito falciforme (WOOD; HSU; GLADWIN, 2008).

O excesso de espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) implica em efeitos prejudiciais ao organismo humano, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e ácido desoxirribonucléico (DNA). Dessa forma, encontram-se relacionados com a fisiopatologia de várias doenças crônicas, como doenças auto-imunes, cardiopulmonares, cânceres e outras, podendo ser a causa ou o fator agravante do quadro geral (DAVID; BARREIROS; DAVID, 2006; GOULART *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo tem um papel crítico na fisiopatologia das doenças renais, e muitas complicações dessas doenças são mediadas por espécies reativas de oxigênio (EROS), relacionados com mediadores do estresse e de inflamação (OZBEK, 2012). Marcadores de peroxidação lipídica, tais como o malondialdeído (MDA), foram significativamente elevados em ratos com nefropatia obstrutiva. Além disso, o aumento das concentrações de EROS e ERNs têm sido observado juntamente com a diminuição da atividade das principais enzimas antioxidantes superóxido desmutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GSR) (MANUCHA *et al.*, 2005).

O óxido nítrico (NO) é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, como nitrito e nitrato, na maioria dos fluidos corporais, inclusive no plasma (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Na presença de superóxido ($O_2^{\bullet -}$), forma peroxinitrito ($ONOO^-$), que promove diferentes efeitos biológicos a partir de três reações: reação redox direta, reação com dióxido de carbono (CO_2) formando $CO_3^{\bullet -}$ e homólise de ácido peroxinitroso.

Associada à redução dos níveis de NO, há elevação dos níveis de endotelina-1 (ET-1), um peptídeo derivado de células tubulares e endoteliais com potente efeito vasoconstritor e pró-inflamatório. Tais eventos contribuem para a patogênese da vaso-oclusão, uma vez que aumentam o tônus vascular, promovendo o estreitamento do lúmen devido à proliferação de fibroblasto e de célula muscular lisa (SWITZER *et al.*, 2006).

As citocinas inflamatórias participam do processo de adesão dos eritrócitos falciformes ao endotélio com subsequente obstrução do fluxo e isquemia tecidual (SCHNOG *et al.*, 2003). Fator de Necrose Tumoral alfa ($TNF-\alpha$), interleucina-1 (IL-1) e IL-18 são citocinas pró-inflamatórias que contribuem para a formação de um trombo pancelular, formado por hemácias falciformes, leucócitos e plaquetas, todos aderidos ao endotélio vascular (PATHARE *et al.*, 2003). A IL-18 induz a liberação de $TNF-\alpha$, IL-1, moléculas de adesão, diminui a síntese de NO e parece desenvolver um importante papel na lesão renal aguda induzida por isquemia-reperfusão em ratos (OKAMURA *et al.*, 1995). Estudos indicam que pacientes com lesão renal crônica têm níveis séricos elevados de IL-18 (GANGEMI *et*

al., 2002; MATSUMOTO; KANMATSUSE, 2001).

A ocorrência de eventos repetidos de vaso-oclusão e anemia crônica ocasionam dor e lesão progressiva em múltiplos órgãos como, cérebro, coração, pulmão, pele e rins (GUASCH; NASS; ZAYAS, 2006).

A descoberta dos haplótipos do gene β^S apresentou um importante elemento de análise antropológica para estudo das composições populacionais, bem como elementos de estudo clínico, os quais podem fornecer dados preditivos acerca da evolução da doença e seu nível de gravidade (GALIZA NETO; PITOMBEIRA, 2003).

Os haplótipos da anemia falciforme têm sido relatados em diferentes regiões do mundo. São classificados em cinco tipos diferentes, de acordo com a origem étnica e geográfica onde predominam. O haplótipo Benin tem sido associado à África Ocidental; o Bantu ou República Centro Africana à África Oriental e Centro-Sul; o Senegal à África Atlântico-Ocidental; o Árabe-Indiano à Índia e Península Arábica e o Camarões à Costa Ocidental Africana (GONÇALVES *et al.*, 2003; NAGEL, 1984; SUTTON; BOUHASSIRA; NAGEL, 1989).

A maioria dos cromossomos com o gene β^S tem um dos cinco haplótipos comuns, contudo existe uma minoria de cromossomos, aproximadamente 5%, que estão associados com haplótipos menos comuns, geralmente designados como haplótipos atípicos (ZAGO *et al.*, 2001). Segundo Zago *et al.* (2000), os haplótipos atípicos são produzidos por diversos mecanismos genéticos, tais como: substituição de um nucleotídeo em um dos sítios polimórficos de restrição; recombinação entre dois haplótipos β^S típicos ou, mais frequentemente, entre um haplótipo β^S típico e um haplótipo β^A diferente; e conversão não recíproca entre cromossomos de uma sequência de DNA, dentre estes, o mecanismo de recombinação parece ser o mais comum.

1.3 Alterações renais na anemia falciforme

O rim pode ser afetado de diversas maneiras na AF, tanto pelas alterações hemodinâmicas devido à anemia crônica, como pelos processos recorrentes de vaso-oclusão, levando a modificações estruturais e funcionais que progridem para a doença renal crônica (KADIRI, 2006). É um órgão vulnerável a danos causados por aumento da geração de EROS, devido à abundância de ácidos graxos poliinsaturados de cadeias longas nos lipídios do parênquima renal (OZBEK, 2012).

As alterações medulares são muito frequentes, uma vez que a medula renal apresenta condições ideais para falcização: pH e pO₂ reduzidos e hipertonicidade. Essa região, composta pelos túbulos renais e estruturas vasculares especializadas, que suprem os néfrons justamedulares, é formada por longas arteríolas eferentes que se estendem dos glomérulos até a porção externa da medula e, a seguir, dividem-se em capilares peritubulares especializados denominados vasos retos. Estas descem pela medula acompanhando lado a lado as alças de Henle, retornam ao córtex para desaguar nas veias corticais (essa rede especializada de capilares situado na medula desempenha papel essencial na formação da urina concentrada). Observa-se com frequência a oclusão dos vasos retos e lesão dos túbulos renais, com atrofia ou dilatação, presença de cilindros proteicos e deposição de ferro com degeneração do epitélio tubular (ATAGA; ORRINGER, 2000; SERJEANT, 2001).

O acometimento renal na AF tem sido relatado desde o início do século XX (JOSEPHS, 1928), sendo observado atualmente em torno de 30 a 50% dos casos podendo evoluir para doença renal crônica terminal (SILVA JUNIOR; LIBÓRIO; DAHER, 2011). As principais complicações observadas nos pacientes com a doença incluem alterações na capacidade de concentração urinária, microalbuminúria, perda de função renal associadas a eventos trombóticos, aumento da perda urinária de proteína ligante do retinol, de β 2-microglobulina e de endotelina-1 (SESSO *et al.*, 1998; THARAUX *et al.*, 2005; ABO-ZENAH; MOHARRAM; EL NAHAS, 2009).

Os múltiplos infartos renais em decorrência das crises vaso-oclusivas (CVO) podem evoluir à fibrose intersticial e insuficiência renal crônica em 4 a 18% dos pacientes (POWARS, 2005; RAYNAL *et al.*, 2007).

A nefropatia na anemia falciforme engloba um espectro de características morfológicas, mudanças laboratoriais e clínicas. É bem caracterizada por manifestações específicas, fatores de risco e prognóstico que incluem poliúria, hematúria, proteinúria, síndrome de insuficiência renal, lesões tubulares e glomerulares (PHAM *et al* 2000). Está associada ao risco elevado de mortalidade, havendo poucas intervenções terapêuticas capazes de aumentar a expectativa de vida (BOLAWRINA, 2012).

Os fatores fisiopatológicos destas alterações hemodinâmicas parecem resultar de uma auto-regulação glomerular alterada, envolvendo o tônus das arteríolas aferentes e eferentes. Estudos comprovam que as prostaglandinas (PGs) são importantes mediadores desta função glomerular alterada nos pacientes com AF (GUASCH; CUA; MITCH, 1996).

As alterações hemodinâmicas na AF se relacionam ao grau de anemia e variam com a idade. Observa-se aumento da taxa de filtração glomerular (FG) e dos fluxos sanguíneos e

plasmáticos efetivos (FSRE e FPPE) em crianças e adultos jovens. Ambos, FG e FPPE, reduzem-se a valores normais durante a adolescência e caem a valores subnormais com a idade (GUASCH; CUA; MITCH, 1996).

Estas manifestações podem refletir uma anormalidade na perfusão ou comportamento vascular. Por exemplo, episódios recorrentes de hematúria e tubular disfunção surgir isquemia medular devido a hipóxia, hipertonia, e acidose no ambiente da medula, juntamente com o seu relativamente baixo fluxo de sangue (NATH; KATUSIC, 2012). Em contraste com a hipoperfusão da medula, o córtex é muitas vezes hiperperfundido, devido à diminuição da resistência vascular renal. Este aumento no fluxo de sangue é atendido pelo aumento da taxa de filtração glomerular. hiperperfusão do rim promovendo glomerulomegaly, podendo evoluir para glomerulosclerose (HOSTETTER, 2003).

Pacientes pediátricos já desenvolvem hiposteinúria (dificuldade de concentrar urina) e hematúria microscópica; apresentam ainda uma taxa de filtração glomerular aumentada, com redução na capacidade de excretar potássio e de acidificar a urina (PHAM *et al.*, 2000; de SANTIS FELTRAM *et al.*, 2002). O aumento na hiperfiltração caracteriza a glomerulopatia, podendo evoluir com microalbuminúria, a qual pode progredir para macroalbuminúria e, conseqüentemente, doença renal terminal. Estudos mostram que a proteinúria grave e a doença renal terminal são observadas em 15 a 30 % dos pacientes com anemia falciforme (ATAGA; ORRINGER, 2000; WESSON, 2002).

1.4 Marcadores de função renal

A creatinina é um metabólito da creatina, sendo produzida nas células musculares. Diariamente, cerca de 1-2% de creatinina é produzida no organismo. Essa concentração pode variar de acordo com a massa muscular. É filtrada livremente no glomérulo e parcialmente secretada ativamente, sendo utilizada na estimacão da taxa de filtração glomerular (SODRE; COSTA; LIMA, 2007). A creatinina sérica é um método bastante empregado na detecção de alterações renais, porém seu uso é limitado devido à variações relacionadas à massa muscular, idade, sexo, além da presença de substâncias endógenas ou exógenas. Além desses fatores, concentrações elevadas de creatinina sérica são observadas apenas quando considerável proteinúria se instala (SUNDARAM, 2011).

A albumina é uma proteína participante do equilíbrio hidrodinâmico presente nos néfrons, sendo pouco excretada (<30 mg/24h). Entretanto, após uma lesão renal, os níveis de albumina filtrada aumentam e a reabsorção tubular torna-se prejudicada devido a saturação de

transportadores. A microalbuminúria é definida como a excreção de albumina entre 30 e 300mg/24h ou 20-200mcg/min, ou em duas determinações separadas por um intervalo superior a três meses. Amostras de urinas isoladas podem ser utilizadas como triagem; em caso de alterações, deve ser confirmada através de uma coleta casual ou de 24h (ZELMNOVITZ,1997). É comumente empregada no diagnóstico precoce de lesão renal, pois precede os demais parâmetros utilizados. Entretanto, não é capaz de distinguir os diferentes tipos de lesão, e nem prevê a progressão da doença, impossibilitando seu uso na monitorização da resposta terapêutica.

Os parâmetros disponíveis atualmente na avaliação da função renal, como creatinina sérica e taxa de filtração glomerular estimada através do *cleareance* de creatinina apresentam baixa sensibilidade e especificidade. Não são capazes de prever alterações renais em seus primeiros estágios, pois se alteram apenas quando o dano renal torna-se extensivo e em grande parte irreversível (MORI; NAKAO, 2007; SUNDARA *et al.*, 2011).

Concentrações séricas de creatinina se encontram a princípio reduzidos devido à elevada excreção pela urina, elevando-se apenas em estágios avançados de nefropatia. Pacientes com AF apresentam taxas de filtração glomerular e fluxo sanguíneos aumentados, portanto o *cleareance* de creatinina é elevado como resultado da hiperfiltração. Quando o quadro de proteinúria significativa se instala, é possível detectar níveis séricos de creatinina aumentados (ALVAREZ; ZILLERUELO; WRIGHT, 2006). De acordo com Powars (2005), 4 a 18% dos pacientes com anemia falciforme irão desenvolver estágio avançado da doença renal. A sobrevida média desses pacientes é de quatro anos e 40% irão a óbito após os primeiros 20 meses de diálise. O interesse pelos estágios iniciais das alterações renais bem como o reconhecimento dos fatores de risco associados à nefropatia tem crescido, pois representa uma complicação grave e frequente entre os pacientes com anemia falciforme (HAYMANN *et al.*, 2010).

Na AF, a nefropatia constitui um dos principais fatores de risco para mortalidade precoce (PLATT, 1994). A detecção precoce e a compreensão dos mecanismos do comprometimento renal em pacientes com AF são necessários a fim de desenvolver terapias que possam reduzir a morbi-mortalidade da doença (SELVARAJ, 2011).

Recentemente, novos biomarcadores de disfunção renal, estão sendo propostos com o objetivo de avaliar a função renal, detectando precocemente alterações em regiões específicas do néfron, monitorar terapia, diferenciar alterações pré-renal, intra-renal e pós renal (FASSETT *et al.*, 2011; URBSCHAT; OBERMÜLLER; HAFERKA, 2011). Vários novos biomarcadores de regiões específicas do néfron tem sido estudados em modelos de lesão renal

em animais e em estudos clínicos (SUNDARAM *et al.*, 2011).

As características de um biomarcador precisam ser cuidadosamente consideradas antes da sua utilidade potencial pode ser determinada. Alguns critérios são importantes para a seleção de biomarcadores renais. Deve ser medido facilmente, com precisão e reprodutibilidade; indicar de forma sensível lesões renais ou uma resposta ao tratamento medicamentoso; fornecer informações clínicas úteis, de fácil interpretação; ter uma relação custo-benefício viável; fornecer informações adicionais àquelas geradas por marcadores convencionais; identificar ou diferenciar tipos específicos de lesão renal; ser aplicável a uma variedade de populações de (raça, idade e gênero). Idealmente, estes biomarcadores devem ser obtidos através de procedimentos o menos invasivo possível ou não invasivo (por exemplo, a coleta de urina) ou ter poucos efeitos mínimos sobre os pacientes (por exemplo, coletas de sangue de rotina). Por conseguinte, têm sido feitos grandes esforços para identificar biomarcadores viáveis de lesão renal no soro, plasma e urina (TESCH, 2010).

1.5 MCP-1 como marcador de doença renal

Componentes moleculares da imunidade humoral (imunoglobulinas, fatores do complemento) e imunidade celular (quimiocinas, moléculas de adesão de leucócitos pró-inflamatórias citocinas e seus receptores solúveis) são conhecidos por desempenhar um papel significativo no desenvolvimento inflamatório na doença renal. Os níveis séricos ou urinários destas moléculas podem ser detectados por metodologia de imunoensaio, e alguns têm se mostrado úteis para serem marcadores sensíveis da resposta imune no rim com injúria (TESCH, 2010).

A proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1), também conhecida como fator de ativação de macrófagos, é produzida e secretada pelas células mesangiais renais (KOHAN, 1992), endoteliais (LUSTER, 1998), epiteliais tubulares (SCHNOUDER; STRIETER; KUNDEL, 1993), musculares lisas e inflamatórias (CARR *et al.*, 1994). Pertence à família das quimiocinas, citocinas que agem no recrutamento de monócitos e macrófagos para o sítio inflamatório por meio da interação de alta afinidade com um grupo de receptores acoplados à proteína G, com sete domínios transmembranais, conhecidos como receptor CCR2, presentes na superfície celular de fibroblastos, macrófagos, monócitos, células endoteliais e células musculares (VALENT *et al.*, 1988; STRIETER *et al.*, 1989; LEONARD; YOSHIMURA, 1990; CHARO *et al.*, 1994).

O gene humano para a MCP-1 está localizado no cromossomo 17 (17q 11.2) e uma

variedade de mediadores regula a expressão de MCP-1 a nível transcricional. Os principais indutores da expressão de MCP-1 são IL-1 β , TNF- α e IFN- γ . Outras citocinas, como IL-4, IFN- α/β , M-CSF, GM-CSF, PDGF, TGF- β , produtos exógenos, como LPS, vírus, e complexos imunes pode ser também indutores potentes. Em contraste, ácido retinóico, glucocorticóides e de estrógeno inibem a expressão de MCP-1 (SUNG *et al.*, 2002).

A interação com o receptor 2 de quimiocina CC (CCR2) leva à liberação de cálcio intracelular pela estimulação da via do PLC-IP3 e ativação da proteína quinase C (PKC). PKC ativa NF- κ B, o qual vários genes que produzem movimento celular direcional. Além de monócitos e macrófagos, MCP-1 pode ativar células NK, eosinófilos, basófilos e células hepáticas (LOETCHER, 1996). Também apresenta outros efeitos nas células-alvo, como libertação de enzimas, expressão de moléculas de adesão e liberação de histamina (MELGAREJO, 2009).

A detecção de MCP-1 em tecidos renais saudáveis e não saudáveis iniciou-se em 1995. Nos primeiros, observou-se uma fraca marcação de MCP-1 nas células epiteliais tubulares em comparação a detecção na nefropatia membranosa, nefropatia por IgA, e glomeruloesclerose, havendo uma correlação com infiltração de macrófagos (PRODJOSUDJADI *et al.*, 1995). A partir de então, a detecção em tecidos renais bem como níveis urinários de MCP-1 tem sido estudados em diversas doenças.

A MCP-1 relaciona-se com a presença de micro e macroalbuminúria (WADA; FURUICHI; SAKAI, 2000) e sua expressão é induzida em doenças com inflamação, tais como nefropatia diabética. Nessa doença, a principal fonte de MCP-1 são os túbulos corticais (CHOW, 2006). O acúmulo de macrófagos e miofibroblastos em torno dos túbulos estão associados com a lesão tubular, levando ao agravamento da função renal (CHOW *et al.*, 2004). Em modelos animais foi observado uma redução da glomeruloesclerose após o uso de antagonistas MCP-1/CCR2, sugerindo o papel de MCP-1 na progressão da doença. Esses achados também sugerem novas possibilidades terapêuticas (KANAMOCI, 2007) mais específicas no tratamento dessas doenças. Elevados níveis de MCP-1 urinária também tem sido relatado em pacientes com nefrite lúpica, e em modelos animais de nefropatia induzida por cisplatina (WADA, 1996).

O monitoramento desta quimiocina na urina é um procedimento não invasivo e pode fornecer um quadro mais dinâmico do estado inflamatório renal em comparação à biópsia (KIM; TAM, 2011), sendo útil em várias doenças (tabela 1).

Quadro 1: Detecção de MCP-1 urinária e sua implicação em doenças renais humanas.

Doença Renal	Implicação	Estudo
Glomerulonefrites crescentes	Diagnóstico/ Resposta à terapia/ Prognóstico	Tam <i>et al.</i> , 2004
Nefrite Lúpica	Diagnóstico/ Resposta à terapia/ Prognóstico	Wada <i>et al.</i> , 1999; Tam <i>et al.</i> , 2004
Nefropatia diabética	Resposta à terapia/ Prognóstico	Ye <i>et al.</i> , 2009; Tam <i>et al.</i> , 2009
Nefropatia IgA	Diagnóstico/ Prognóstico	Grandaliano <i>et al.</i> , 1996; Stangou <i>et al.</i> , 2009.
Nefropatia membranosa	Prognóstico	Yoshimoto <i>et al.</i> , 2004
Rejeição Renal	Diagnóstico/ Resposta à terapia	Dubínski <i>et al.</i> , 2008
Nefropatia obstrutiva	Prognóstico	Grandaliano <i>et al.</i> , 2000
Insuficiência Renal Aguda	Diagnóstico	Munshi <i>et al.</i> , 2011

Fonte: Adaptado de: KIM e TAM, 2011.

1.6 MCP-1 na Anemia Falciforme

Interações entre monócitos-endotélio desempenham um papel importante em doenças inflamatórias e podem modular a vasculopatia das células na anemia falciforme, um distúrbio com um componente inflamatório importante, onde vaso-oclusão é um elemento importante da fisiopatologia da doença. Interações entre células sanguíneas, fatores plasmáticos e células endoteliais produzem inflamação, estresse oxidativo e ativação endotelial (ZENNADI *et al.*, 2008).

A adesão de monócitos a células endoteliais (ECs) resulta na indução de genes envolvidos na sua migração trans-endotelial e diferenciação em macrófagos (LIM *et al.*, 1998; ZENNADI *et al.*, 2008).

Os pacientes com anemia falciforme apresentam contagem de monócitos elevada em estado ativado. A ativação destas células promove maior liberação de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF α) e IL-1b (POWARS, 1994; INWALD *et al.*, 2000; SURESH *et al.*, 2003). Foi observado um aumento na liberação de íons superóxido em monócitos de pacientes com anemia falciforme em resposta a agonistas *in vitro*, o que pode contribuir para a lesão vascular (DIAS-DA-MOTTA *et al.*, 1996). Belcher *et al.* (2000)

sugere que a ativação monocítica envolve um aumento na expressão de CD11b, IL-1b e TNF- α intracelular.

Os estudos sobre MCP-1 na anemia falciforme são escassos e estão relacionados com o seu papel no processo inflamatório da doença. Chantrathammachart *et al.* (2012) observaram a redução na inflamação e no dano celular através da diminuição dos níveis séricos de MCP-1 e outras citocinas pró-inflamatórias em ratos, após a inibição do fator tissular endotelial. Estudo *in vitro* conduzido por (SELVARAJ *et al.*, 2003), demonstrou um aumento na expressão de citocinas pró inflamatórias MCP-1, TNF- α , IL1- β em monócitos de pacientes com anemia falciforme, quando comparado às células de indivíduos saudáveis. Na anemia falciforme constitui um potencial biomarcador de lesão renal, considerando o quadro inflamatório bem descrito nessa patologia.

1.7 O papel da Hidroxiuréia

Hidroxiuréia (HU) é o principal fármaco disponível para o tratamento de anemia falciforme liberado pela agência norte-americana FDA (Food and Drug Administration) (BUCHANAN *et al.*, 2004; STUART *et al.*, 2004). A HU age aumentando os níveis de hemoglobina fetal (HbF), reduzindo, portanto, a polimerização da HbS, e o fenômeno vaso-oclusivo. Alguns estudos mostram que a HU é um doador de óxido nítrico (NO) que pode ser oxidada pela hemoglobina e formar a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO (GLADWIN *et al.*, 2002). Além disso, a HU pode se decompor química ou enzimaticamente em NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase. Outros estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da NO guanilato ciclase, que resultam na produção de NO (COKIC *et al.*, 2008; CANALLI, 2008b).

A HU é considerada como um agente citotóxico, mutagênico, recombinogênico e antineoplásico e está indicada para pacientes, incluindo crianças, com três ou mais episódios de crises vaso-oclusivas; uma crise torácica aguda recidivante; um ou mais acidentes vasculares encefálicos; priapismo recorrente e anemia grave e persistente, nos últimos 12 meses (SILVA; SHIMAUTI, 2006).

Estudos têm demonstrado que a terapia com hidroxiuréia (HU) reduz em 40% os óbitos associados à anemia falciforme. O benefício terapêutico da HU baseia-se no aumento dos níveis de hemoglobina fetal (Hb F), uma hemoglobina geneticamente distinta que inibe a polimerização de hemoglobina falciforme (Hb S) deoxigenada, impedindo ou dificultando o

surgimento de sintomas relacionados a esta patologia (STEINBERG, 2003; CHARACHE, 1996).

Outros mecanismos de ação da HU estão descritos e incluem: alteração na interação entre eritócitos-endotélio; melhora nos aspectos reológicos das células vermelhas, e consequentemente do fluxo pelos vasos sanguíneos; mielossupressão (STEINBERG, 2003).

Um estudo de fase III randomizado, duplo-cego avaliou o uso da HU em crianças com anemia falciforme (BEBÊ HUG, 2012), testando a hipótese de que a hidroxiuréia pode evitar disfunção renal, reduzindo a hiperfiltração glomerular. O tratamento com o fármaco por 24 meses não influenciou a TFG dos pacientes. No entanto, foi associado com uma melhor capacidade de concentração de urina e menor hiperfiltração, sugerindo o benefício (ALVAREZ *et al.*, 2012). Em outro estudo multicêntrico não houve diferenças significantes entre o grupo em uso de hidroxiuréia e o placebo em incidência de insuficiência renal 9,2% vs 9,5% (STEINBERG *et al.*, 2003). Outro estudo também descreve três pacientes pediátricos com doença falciforme e nefropatia que haviam iniciado inibidores da enzima conversora angiotensina com decréscimo da proteinúria; subseqüentemente iniciaram também HU com adicional redução na proteinúria atingindo níveis subnefróticos próximos à faixa de normalidade (RYBICKI *et al.*, 2003).

Além de aumentar a HbF, alguns estudos mostram que a HU é um doador de NO. Ela pode ser oxidada pela hemoglobina e formar a nitrosilhemoglobina (HbNO) e o NO (GLADWIN *et al.*, 2002). Além disso, a HU pode se decompor química ou enzimaticamente em NO através das enzimas peroxidase, urease e catalase. Outros estudos mostram que a HU estimula a fosforilação e a ativação da eNOS que resultam na produção de NO (COKIC *et al.*, 2008; CANALLI, 2008b).

Diante desse contexto, entendemos que identificação de biomarcadores de lesão renal precoce e sua inserção na prática clínica contribuirão para elucidação dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento das síndromes renais nesses pacientes, facilitando o desenvolvimento de estratégias mais eficazes na prevenção dessas complicações e no tratamento da AF.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o uso da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) como biomarcador de lesão renal precoce em pacientes adultos com AF tratados ou não hidroxiureia.

2.2 Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o perfil clínico-epidemiológico (manifestações clínicas, uso de medicamentos, idade, sexo) e laboratorial (hemograma; uréia e creatinina plasmáticas; taxa de filtração glomerular estimada, creatinina, proteína e albumina urinária;
- ✓ Verificar os níveis urinários de MCP-1 de pacientes, comparando-o com o grupo controle;
- ✓ Quantificar o malonaldeído (MDA) urinário e NOx plasmático
- ✓ Avaliar os níveis de MCP-1 de acordo com os haplótipos do gene da beta globina S;
- ✓ Associar os níveis de MCP-1 com contagem diferencial de monócitos, microalbuminúria, taxa de filtração glomerular estimada, proteinúria, MDA e NOx, ;

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo transversal, observacional e analítico com 50 pacientes adultos com diagnóstico molecular de AF atendidos no Hospital Universitário Walter Cantídio-HUWC. Os pacientes foram selecionados de acordo com os critérios de seleção da amostra.

3.2 Seleção da Amostra

3.2.1 Critérios de Inclusão

Grupo de pacientes

- Pacientes adultos ($\geq 18 \leq 65$ anos) de ambos os sexos com AF em uso ou não de HU (faixa escolhida para evitar interferência do fator idade nos resultados).
- Diagnóstico de HbSS confirmado por PCR -RFLP.
- Pacientes sem crises álgicas, infecções e transfusões sanguíneas nos últimos três meses (BALLAS *et al.*, 2012), sem histórico de complicações renais (transplante, hemodiálise).

Grupo Controle

- Indivíduos adultos (≥ 18 anos) de ambos os sexos;
- Indivíduos sem hemoglobinopatias (HbAA);
- Indivíduos sem alterações renais (sem histórico de doenças renais);

3.2.2 Critérios de Exclusão

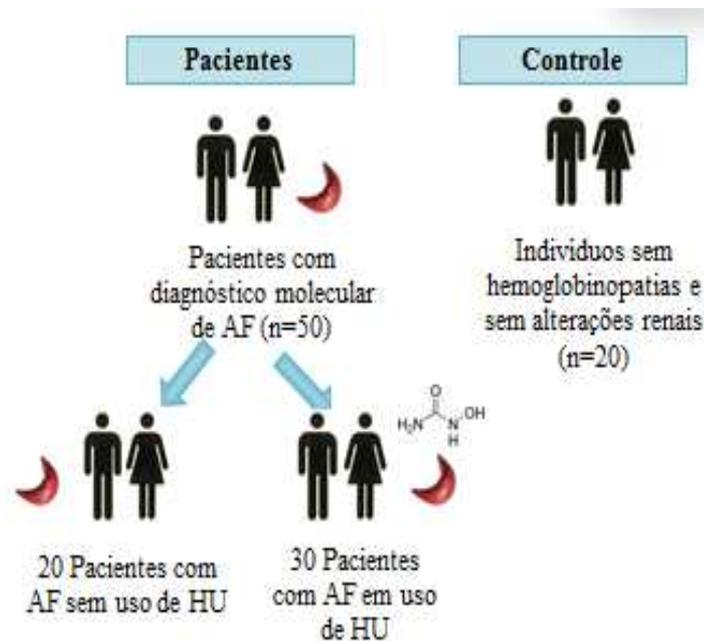
- Pacientes que tenham realizado terapêutica transfusional nos últimos três meses;
- Pacientes diabéticos, tabagistas, etilistas, hipertensos (P.A $\geq 14 \times 9$ mmHg);
- Pacientes com doença renal (ureia e creatinina plasmáticas alteradas), submetidos ou não a transplante renal;

3.3 Locais de Estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHDGH) da UFC e Laboratório de Toxicologia da UFC.

3.4 Amostragem

Figura 4: Amostragem do estudo.



3.4.1 Coleta de dados

Os pacientes com AF que preencherem 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.

Os parâmetros epidemiológicos (idade, sexo, uso de medicamentos e manifestações clínicas no último ano) e laboratoriais (hemograma, contagem de reticulócitos, ureia e creatinina plasmáticas) foram obtidos a partir dos prontuários médicos.

3.4.2 Coleta de amostra biológica

Plasma

Foram coletados 4 ml de sangue periférico colhidos em anticoagulante heparina, segundo a figura abaixo.

Urina

Amostras isoladas de urina foram colhidas. As amostras foram centrifugadas para remoção do precipitado, estocadas a -80 C° , com inibidor de protease, e descongeladas no dia da análise. O ritmo de filtração glomerular foi estimado a partir da equação do MDRD (LEVEY; STEVENS, 2009).

Figura 5: Fluxograma de coleta de amostras biológicas



3.5 Testes Laboratoriais

3.5.1 Sumário de urina

A análise do exame de urina ou EAS foi feita avaliando os seguintes aspectos: análise física, química e microscópica. Foram utilizadas fitas reagentes (Labtest®) para análise da densidade, hemoglobina e leucócitos.

3.5.2 Dosagem do malonaldeído

O método empregado para determinação do MDA em amostras biológicas foi baseado na sua reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS). Nesta reação, duas moléculas de TBARS reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar um cromóforo róseo que tem absorvância máxima em solução ácida 535 a 560 nm. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas com 1mL de Triton X-100. Então, 250 μ L do plasma foram adicionados a tubos de vidro e incubados em banho-maria a 37 °C por 1 h, seguido por adição de 400 μ L de ácido perclórico a 35% para precipitar as proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 10 min. e 600 μ L do sobrenadante, adicionados a 200 μ L de uma solução de ácido tiobarbitúrico a 0,6%. A mistura foi levada a banho-maria e aquecida a 95 °C por 30 min. Após resfriada, a absorvância foi medida em um leitor de microplacas a 560 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

3.5.3 Dosagem do nitrito

A concentração de nitrito foi determinada segundo o método de (GREEN *et al.*, 1981), que baseia-se na detecção de nitrito em uma amostra (urina, plasma, homogenato tecidual) por uma reação de diazotização, formando um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm. Para esse teste, 100 μ L do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina 0.1%) foram adicionados a 100 μ L do plasma e incubados à temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO₂ (variando de 0,39 a 100 μ M) sob as mesmas condições. Os brancos foram preparados pela adição de 100 μ L do reativo de Griess a 100 μ L do plasma e a absorvância medida em leitor de microplacas em 540 nm.

3.5.4 Creatinina urinária

A quantificação de creatinina foi realizada por método colorimétrico, de reação em ponto final (Labtest®). A técnica baseia-se na reação com a solução de picrato em meio alcalino, formando um complexo de cor vermelha que é medido fotometricamente a 510nm (BASQUES, 2005).

3.5.5 Proteinúria

Foi realizado por método colorimétrico. Baseia-se na reação do vermelho de pirogalol com o molibdato de sódio formando um complexo que, quando combinado com a proteína em meio ácido, desenvolve um cromóforo azul, com o máximo de absorção em 600 nm. A absorbância resultante é diretamente proporcional à concentração de proteína na amostra (WESTGARD; BARRY; HUNT, 1981).

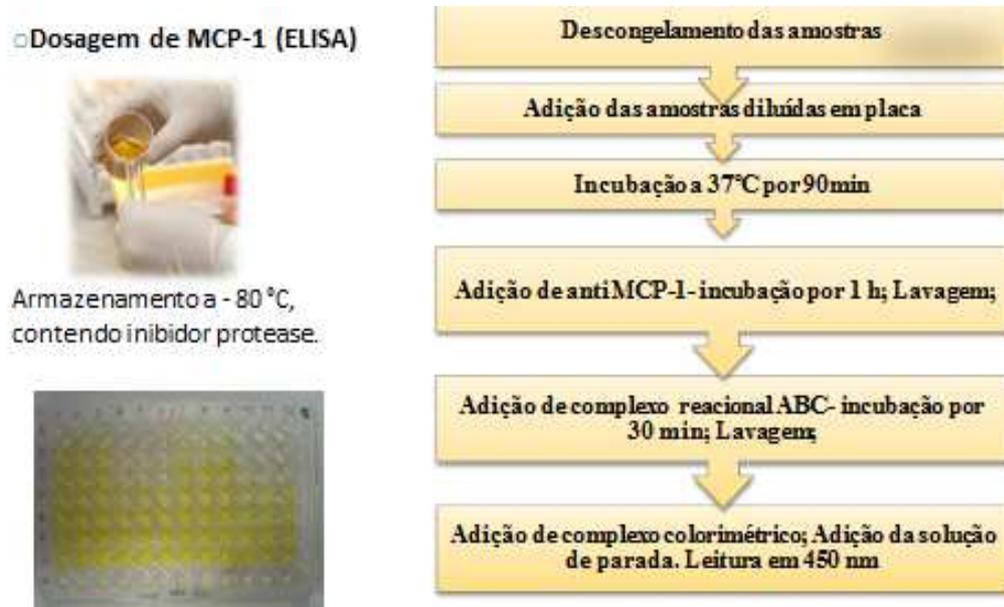
3.5.6 Microalbuminúria

Foi realizada por método turbidimétrico (**Labtest®**). Baseia-se na reação entre anticorpo anti-albumina humana e a albumina presente na urina levando à formação de agregados insolúveis, que podem ser medidos por turbidimetria. A intensidade da aglutinação, medida em absorbância (505nm), está relacionada à quantidade de albumina, cuja concentração é obtida através da curva de calibração (BASQUES, 2005). O valor obtido foi convertido em mg/grama de creatinina.

3.5.7 MCP-1/CCL2

A análise foi realizada em amostras de urina por meio da técnica de imunoenensaio ligado à enzima (ELISA). Foi utilizado kit comercial da Boster Imunoassays®. A leitura foi realizada na leitora de ELISA, Biotek ELX800. Os valores foram expressos em pg/mcg de creatinina urinária. As amostras foram diluídas com diluente fornecido, na proporção de (1:10), segundo orientações do fabricante. As etapas estão representadas no esquema abaixo. A lavagem da placa foi realizada com lavadora semiautomática, utilizando-se tampão preparado conforme especificação do fornecedor.

Figura 6: Etapas da dosagem de MCP-1 urinária



3.6 Aspectos Legais e Éticos

O estudo foi conduzido de acordo com os princípios legais e éticos que orientam as pesquisas com seres humanos, baseadas na resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde- Ministério da Saúde (BRASIL,1996).

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (UFC) e aprovado sob o número de protocolo 07240313.3.0000.5045.

3.7 Análises Estatísticas

A análise estatística foi realizada com o auxílio do programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão da média (D.P.M.) e a comparação entre as médias dos grupos foi realizada utilizando o teste t de Student, e análise de variância (ANOVA) seguida pelo Teste de Tukey. As correlações foram analisadas através do coeficiente de Pearson. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0.05$.

4 RESULTADOS

Os dados do estudo foram obtidos através da análise de prontuários e de amostras de 50 pacientes com anemia falciforme. A média de idade foi de 33.2 ± 10.3 anos, sendo 22 (73.3%) do sexo feminino e 8 (26.7%) do sexo masculino no grupo SSHU; 10 (50%) feminino e 10 (50%) masculino no grupo SS; 14 (70%) feminino e 6 (30%) masculino no grupo Controle. Os pacientes apresentaram anemia moderada com redução de Hb e Ht. Houve uma diferença significativa na contagem de monócitos entre o grupo controle e os pacientes ($p < 0.0001$) e entre o grupo SSHU e SS (0.039). A análise do sedimento urinário revelou uma redução na densidade no grupo de pacientes ($p < 0.001$) e no grupo SS em relação ao grupo SSHU ($p < 0.001$). A presença de hemácias e de leucócitos foi semelhante nos dois grupos. Os parâmetros creatinina, ureia e proteína foram semelhantes entre os grupos. A taxa de filtração glomerular estimada apresentou-se elevada nos pacientes em comparação ao grupo controle ($p = 0.0024$). Observou-se também um aumento na albumina urinária dos pacientes ($p < 0.0001$) (Tabela 1).

Tabela 1: Dados clínicos e laboratoriais dos grupos controle (n=20), SSHU (n=30) e SS (n=20).

Parâmetros	<u>Média ± DPM</u>			P
	SSHU (n=30)	SS (n=20)	Control (n=20)	
Idade	34.9 ± 10.3	31,5 ± 10,2	33,3 ± 10,2	0.504
Sexo (M/F)	8:22	10:10	6:14	N/A
PAs (mmHg)	11.7 ± 0.4	11.0 ± 1.2	10.7 ± 1.0	0.17
PAd (mmHg)	7.0 ± 0.8	7.5 ± 0.5	7.8 ± 1.0	0.18
<u>Análise Laboratorial</u>				
<i>Hemograma</i>				
Hb (g/dL)	8,95 ± 1,44	8,57 ± 1,02	15,15 ± 2,4 ^a	a < 0,001
Ht %	24,54 ± 3,67	23,40 ± 5,06	41,5 ± 5,6 ^a	a < 0,001
Leucócitos /mm ³	8567 ± 2775	9540 ± 4226	7.120,5 ± 1650,4	0.608
Monócitos /mm ³	728,8 ± 296,3	1064 ± 443,3 ^{*b}	420,8 ± 102,4	a < 0.0001; b 0.024
Plaquetas /mm ³	390.417 ± 127.793	306.778 ± 188.54	379.530 ± 15.200	0.251
Reticulócitos (%)	10.16 ± 3.39	8.8 ± 2.71	1.33 ± 0.44 ^a	a 0.0001

Hb- hemoglobina; Ht- hematócrito; PAs- pressão arterial sistólica; PAd- pressão arterial diastólica; a- controle vs pacientes; b- grupo SSHU vs grupo SS; diferença estatisticamente significante quando $p < 0.05$.

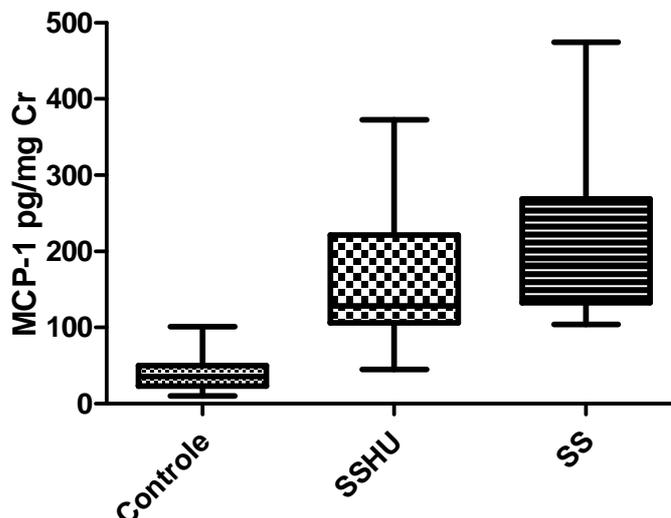
Tabela 2: Avaliação da função renal dos grupos controle (n=20), SSHUe SS (n=50).

Parâmetros	Média ± DPM			Valor de p
	SSHU (n=30)	SS (n=20)	Control (n=20)	
Hematúria /campo	7.96 ±3.56	9.66±2.96	< 5	b= 0.08
Leucócitos / campo U	9.37±3.53	11.00±3.38	< 4	b=0.14
Creatinina sérica mg/dl	0,69 ± 0,28	0,84 ± 0,40	0,8 ± 0,13	0.250
Ureia sérica mg/dL	22,33 ± 6,97	24,06 ± 4,01	26,136 ± 3,91	0.123
TGFe (ml/min/1.73m ²)	137.9± 40.7	140.1± 53.9	95.9± 19.92 ^a	0.0024
Proteína U mg/dL	10,61 ± 8,95	10,82 ± 11,10	8.61± 2,94	0.925
Albumina U mg/gCr	11.85± 9.16	14.13± 12.22	3.12± 4.35 ^a	a<0.0001

TGFe- taxa de filtração glomerular estimada; a- controle vs pacientes; b- grupo SSHU vs grupo SS; diferença estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

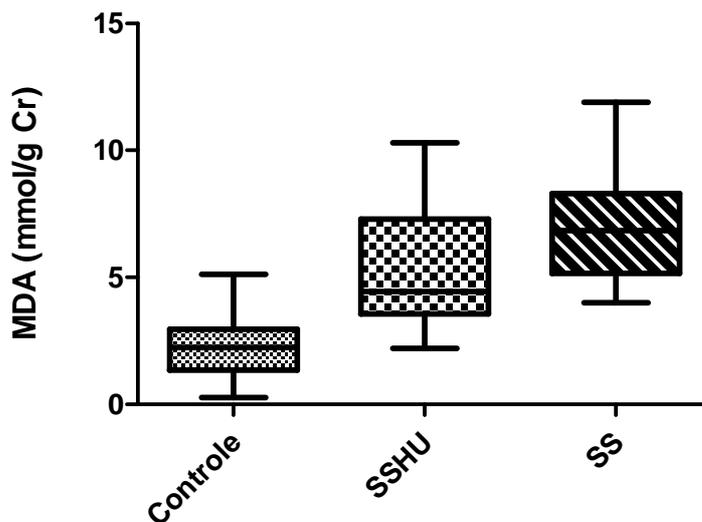
O gráfico 1 mostra os níveis de MCP-1 em pg/mgCr, nos diferentes grupos. Os valores em média e desvio padrão para os grupos foram: Controle (42.12±27.6), grupo SSHU (166.2± 88.37) e grupo SS (219.7 ± 115.0). Houve um aumento significativo no grupo de pacientes comparado ao controle ($p < 0.001$) e no grupo SS em relação ao grupo SSHU ($p = 0.0392$).

Gráfico 1: Níveis de MCP-1 urinária nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20); SSHU (n= 30); SS (n=20).



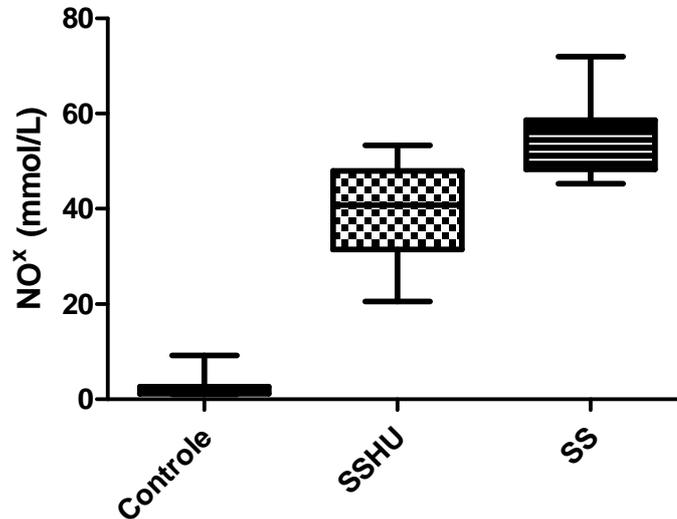
O gráfico 2 mostra os níveis de MDA nos grupos. Os valores em média e desvio padrão para os grupos foram: Controle (2.29 ± 1.13), grupo SSHU (5.25 ± 2.33) e grupo SS (6.93 ± 2.12). Observou-se um aumento nos pacientes comparados ao controle ($p < 0.0001$) e entre os grupos SS em relação ao grupo SSHU ($p=0.006$).

Gráfico 2: Níveis de MDA urinário nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20); SSHU (n= 30); SS (=20).



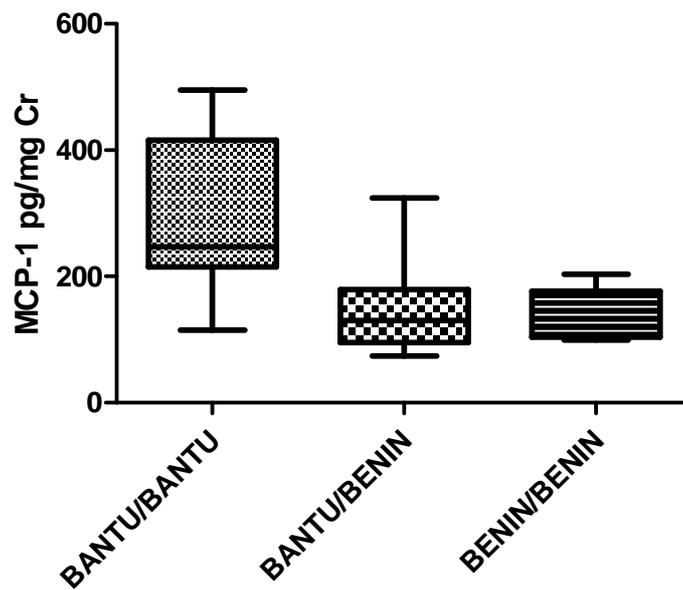
Os níveis de óxido nítrico foram dosados através do seu metabólito, o nitrito. Os valores em média e desvio padrão para os grupos foram: Controle (2.25 ± 1.9), grupo SSHU (39.12 ± 10.33) e grupo SS (56.54 ± 7.10). Foram encontrados valores elevados nos pacientes comparados ao controle ($p < 0.0001$) e entre o grupo SSHU em relação ao grupo SS ($p=0.001$). Os valores estão representados no gráfico 3.

Gráfico 3: Níveis de NO^x plasmático nos diferentes grupos analisados. Controle (n=20); SSHU (n= 30); SS (=20).



O gráfico 4 mostra os níveis de MCP1 estratificados de acordo com o haplótipo da globina β^S . Houve uma diferença significativa entre o haplótipo BANTU/BANTU ($265,8 \pm 135,4$) e os demais ($p=0.02$) e entre o BANTU/BENIN ($147,9 \pm 74,20$) e BENIN/BENIN ($145,7 \pm 42.24$) ($p=0.01$)

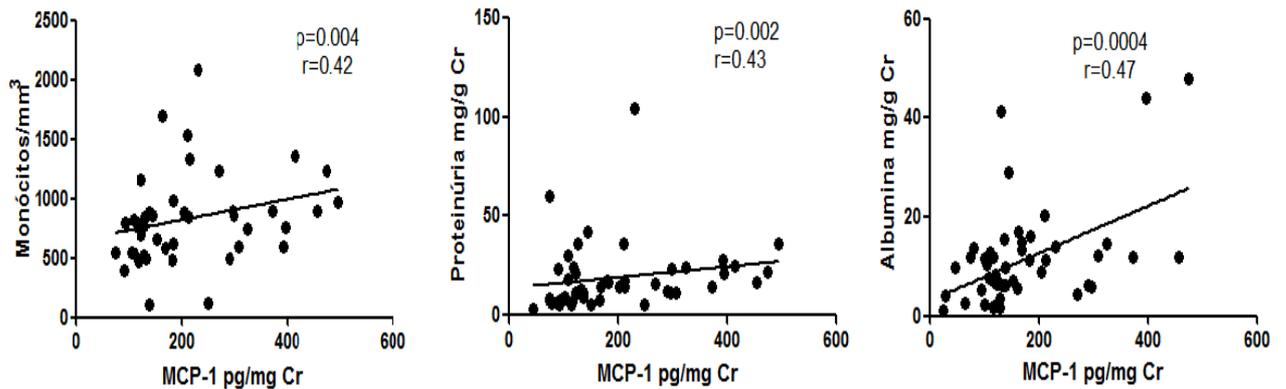
Gráfico 4: Diferenças entre as dosagens de MCP-1 segundo os principais haplótipos da globina β^S .



BANTU/BANTU (n=9); BANTU/BENIN (n=10); BENIN/BENIN (n=5).

A figura 7 apresenta as correlações entre os níveis de MCP-1e a contagem de monócitos, proteinúria e albuminúria. Obteve-se correlação positiva com os três parâmetros.

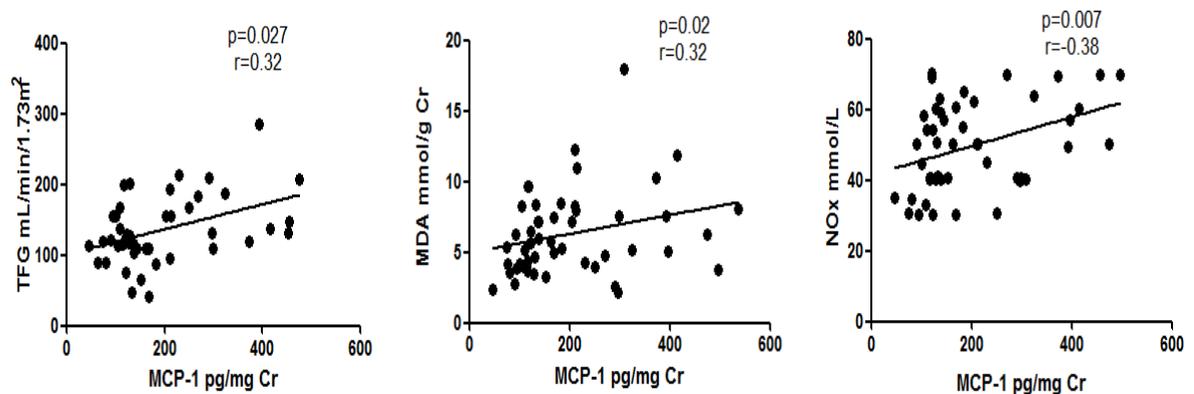
Figura 7: Correlação entre concentrações de MCP-1 e os parâmetros contagem de monócitos, proteinúria e albuminúria.



r = coeficiente de Pearson; significância estatística: $p<0.05$

A figura 8 apresenta a correlação entre MCP-1 e os parâmetros: taxa de filtração glomerular, MDA, e nitrito. Observou-se uma correlação positiva apenas com os níveis de MDA, nitrito e TFG.

Figura 8: Correlação entre concentrações de MCP-1 e taxa de filtração glomerular (TFG), MDA urinário e NOx plasmático. r = coeficiente de Pearson; significância estatística: $p<0.05$.



r = coeficiente de Pearson; significância estatística: $p<0.05$

5 DISCUSSÃO

No presente estudo, os pacientes apresentaram valores de hemoglobina e hematócrito reduzidos, significativamente, e reticulocitose em comparação com o controle. Resultados semelhantes são observados na literatura (GUASCH; NASS; ZAYAS, 2006; SUNDARAM *et al.*, 2011), refletindo assim o estado de hemólise crônica a que os pacientes com AF estão submetidos.

A ocorrência das crises de vaso-oclusões, principalmente em pequenos vasos, representa o evento fisiopatológico determinante na origem da grande maioria dos sinais e sintomas presentes no quadro clínico dos pacientes com anemia falciforme. (QUINN *et al.*, 2007). No presente ensaio, as principais manifestações clínicas observadas foram fraqueza e dor óssea, sendo relatadas mais frequentemente no grupo de pacientes que não estavam em uso de HU. A hidroxiuréia tem sido usada no tratamento da anemia falciforme, tendo demonstrado redução na maioria das manifestações dolorosas. (WOOD; GRANDER, 2007).

Os principais medicamentos utilizados pelos pacientes foram ácido fólico, dipirona e o anti-inflamatório AAS, estando de acordo com a Organização Mundial de Saúde, que preconiza o uso de analgésico não opióides e antiinflamatórios não esteroidais (AINES) para tratamento inicial da dor na AF. Mesmo no estado basal, os pacientes apresentaram manifestações clínicas, relatadas no prontuário citados há pelo menos um ano. Entretanto, não houve diferença significativa quanto à dosagem de MCP-1, quando estratificada pela presença de manifestações e o uso de medicamentos. O que se observou foi uma tendência à redução no grupo que apresentou sintomas e no grupo que fazia uso de fármacos. Considerando que os pacientes que apresentaram algum tipo de sinal ou sintoma citado, fizeram uso de algum dos fármacos, pode-se sugerir que o uso do medicamento pode ter atenuado o quadro inflamatório do paciente, levando a níveis reduzidos de MCP-1.

Quanto à avaliação da função renal, foi observado em nosso estudo um aumento na TFG em relação ao controle e uma tendência a uma elevação em pacientes que não faziam uso de HU em comparação com outros grupos. Aygun *et al.*, 2013 também observou esse aumento na taxa de filtração em pacientes pediátricos com AF (AYGUN *et al.*, 2013). Segundo Sundaram *et al.* (2011), as complicações renais não são identificáveis nas fases iniciais da nefropatia falciforme, uma vez que os biomarcadores clássicos de dano renal não são informativos nesta doença. Níveis de creatinina plasmática são baixos devido à excreção

supra-normal de creatinina na urina e aumento nesses níveis são observados, portanto, somente nos últimos estágios da doença. Os pacientes também podem apresentar maiores taxas de filtração e fluxo sanguíneo renal, e, por conseguinte, a depuração da creatinina urinária é elevada, devido à hiperfiltração.

Hiperfiltração glomerular e microalbuminúria / proteinúria são manifestações iniciais da nefropatia falciforme. A microalbuminúria foi observada em dois pacientes do grupo SSHU (41 e 29 mg/g de creatinina) e em dois do grupo SS (44 e 48 mg/g de creatinina), correspondendo a 8% do total de pacientes. Sundaram *et al.* (2011) observaram 40.5% de microalbuminúria em pacientes com anemia falciforme e Guasch, Nass e Zayas (2006), documentaram que aproximadamente 42% dos pacientes adultos com anemia falciforme apresentam microalbuminúria. A discordância entre os dados da literatura e os do presente estudo deve-se possivelmente à amostra, que foi de 103, 116 e 50 respectivamente. Além desse fator, no estudo de Guasch, Nass e Zayas (2006), foram incluídos pacientes que já apresentavam insuficiência renal, onde a microalbuminúria foi estratificada apenas de acordo com a idade.

Poucos estudos avaliam a MCP-1 na anemia falciforme. Selvaraj *et al.* (2003) estudaram leucócitos de pacientes com AF e observaram que os monócitos isolados a partir de pacientes com AF encontram-se num estado ativado demonstrado pelo aumento da expressão do gene de citocinas (TNF - α e IL - 1), bem como quimiocinas (MCP - 1, IL - 8, e MIP - 1), em comparação com os monócitos de indivíduos saudáveis (SELVARAJ, 2003). No presente estudo, obteve-se uma correlação entre a contagem de monócitos e os níveis de MCP-1. Os pacientes que não faziam uso de HU apresentaram aumento na contagem de leucócitos e de monócitos em comparação com o grupo de pacientes que tomam este medicamento. Os resultados confirmam o papel da hidroxureia na redução da adesão de leucócitos e do estado inflamatório na AF, verificado em outros estudos (MANFREDINI, 2008).

Estudos mostram a proteinúria e microalbuminúria como marcadores precoces de lesão renal em pacientes com anemia falciforme. Microalbuminúria pode ser encontrada em pacientes pediátricos, progredindo para macroalbuminúria ao longo dos anos (AYGUN *et al.*, 2011; SUNDARAM *et al.*, 2011). No presente estudo foi observado que ambos os parâmetros encontravam-se dentro dos níveis de normalidade para os pacientes, porém houve uma correlação positiva entre os níveis de MCP-1 e os dois parâmetros. Evidências de estudos clínicos e em modelos animais demonstram que a MCP-1 desempenha um papel crítico na patogênese de várias doenças renais, e a dosagem de MCP-1 urinária constitui um grande potencial como um biomarcador para diagnóstico, prognóstico e resposta terapêutica (KIM,

2011)

A medula renal torna-se mais susceptível aos danos causados pela peroxidação lipídica, uma vez que a apresenta condições ideais para falcização como pH e pO₂ reduzidos e hipertonicidade. O acúmulo de MDA altera a organização dos fosfolípidos da membrana, contribuindo para o processo de degeneração celular (HUNDEKAR *et al.*, 2010). No presente estudo, foi realizado a dosagem urinária de MDA, sendo observado aumento significativo nos pacientes em relação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram obtidos com a dosagem sérica em pacientes com AF adultos, no estado basal por Elias *et al.* (2012), Hundekar *et al.* (2010) e Tito *et al.* (2004) em pacientes adultos, no estado basal.

Os pacientes em uso de HU apresentaram níveis menos elevados de MDA quando comparados ao grupo SS. A atividade antioxidante da hidroxiuréia provavelmente reduziu os danos causados por ROS, levando a uma menor produção de MDA no grupo SSHU. A associação positiva observada com MCP-1 sugere que além de marcador específico de função renal, MCP-1 pode refletir o dano oxidativo nas membranas glomerulares e de células tubulares.

No presente estudo, os níveis séricos de nitrito apresentaram-se significativamente elevados nos pacientes com AF em relação ao grupo controle, o que pode ser justificado pelo fato de que na AF ocorra um aumento do consumo de NO, gerando aumento dos níveis dos seus metabólitos. Resultados semelhantes foram encontrados por Rusanova *et al.* (2010), e por Hundekar *et al.* (2012), que observaram aumento dos níveis de nitrito em pacientes com AF, em relação indivíduos saudáveis. Como metabólitos do óxido nítrico, o NO^x (nitrito e nitrato) são marcadores de seu consumo por espécies reativas de oxigênio e pela autooxidação da hemoglobina, refletindo o estado de estresse oxidativo (FIGUEREIDO, 2007).

Ainda, no presente estudo observou-se que a HU pode ter influenciado nos níveis de óxido nítrico, já que os valores nesse grupo foram menores se comparados ao grupo SS. O óxido nítrico (NO) é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, como nitrito e nitrato, na maioria dos fluidos corporais, inclusive no plasma (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Na presença de O₂ •-, forma ONOO-, que promove diferentes efeitos biológicos a partir de três reações: reação redox direta, reação com CO₂ formando CO₃•- e ácido peroxinitroso.

Segundo Maier-Redelsperger *et al.* (2010), o processo de hemólise, induz a vasoconstrição renal pela remoção de NO, tornando-se um fator de risco para a hiperfiltração, proteinúria e insuficiência renal crônica na AF. Entretanto, também a presença de hiperfiltração parece acontecer devido à hiperperfusão.

Natch e Katusic (2012) propuseram que na AF, a hemólise, por si só pode induzir

a vasodilatação, tanto regionalmente ou sistemicamente, por causa da natureza instável de hemoglobina S. Esta instabilidade conduz à libertação de heme e à indução da hemeoxigenase-1 (OH-1). A OH-1 exerce efeito vaso-relaxante, através da geração de monóxido de carbono e de remoção de agentes oxidantes. Estudos anteriores que demonstram o aumento dos níveis plasmáticos de heme na AF (REITER *et al.*, 2012), e que heme oxigenase-1 é robustamente induzida no endotélio e células musculares lisas nas artérias renais, reforçam essa hipótese (NATH *et al.*, 2001). A fração heme liberada é pró-inflamatória, e indutora de MCP-1 (NATH *et al.*, 2003), promovendo uma lesão vascular (TRACZ; ALAM; NATH, 2007). Finalmente, o transporte de heme através da barreira de filtração glomerular expõe o endotélio e podócitos a um metabolito com efeitos citotóxicos e pró-apoptóticos, prejudicando assim a permeabilidade seletiva glomerular e causando proteinúria (GONZALEZ-MICHACA *et al.*, 2004; BELCHER *et al.*, 2010). Portanto, o aumento de MCP-1 está relacionado através do processo de hemólise, ao consumo de NO, e consequentemente ao aumento de seus metabólitos.

Ao estratificar os pacientes quanto ao haplótipo da globina S, obteve-se uma diferença significativa nos níveis de MCP-1. Estudos sugerem que o haplótipo Bantu está associado a uma maior incidência de complicações clínicas do que o haplótipo Benin (ADORNO *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2003; NAGEL, 1984; POWARS, 1991; STEINBERG, 2001). Em nosso estudo houve diferença estatisticamente significativa entre os haplótipos Bantu/Bantu, Bantu/Benin e Bantu/Benin em relação aos níveis de MCP-1. Os três haplótipos citados foram os mais frequentes, porém houve a presença do haplótipo Bantu/Atípico em dois pacientes.

Silva *et al.* (2010) demonstraram maior presença de crises vaso-oclusivas e episódios de pneumonia no haplótipo Benin/Atípico do que no haplótipo Bantu/Atípico; e maior presença de crises de infecção urinária no haplótipo Benin/Atípico do que no haplótipo Benin/Benin.

Em resumo, os resultados demonstraram que, apesar de as alterações renais na anemia falciforme se iniciarem na infância, os pacientes avaliados apresentaram a função renal, segundo os parâmetros utilizados na prática clínica, dentro da normalidade, porém mesmo nesses pacientes, os níveis de MCP-1 já encontram-se elevados se comparados a indivíduos saudáveis. Os pacientes com anemia falciforme se encontram em um estado oxidativo que pode afetar muitos órgãos, por exemplo, os rins.

Discretas alterações podem estar presentes e não são detectados pelas metodologias comumente utilizadas. Diante do observado, MCP-1 apresenta-se como biomarcador preditivo MCP1 de lesão renal que pode refletir o dano causado pelo estresse oxidativo presente na AF.

A diferença dos resultados entre os que usavam ou não HU, mostraram que MCP-1 além de ser preditivo na detecção de lesão renal, pode ser utilizado na avaliação da resposta ao tratamento.

6 CONCLUSÕES

A idade variou de 20 a 35 anos no grupo SSHU e de 20 a 40 anos no grupo SS. Os pacientes apresentaram reticulocitose. Observou-se aumento na a contagem de monócitos elevada em relação ao grupo controle e no grupo SS comparada ao grupo SSHU. Os parâmetros de função renal proteinúria, creatinina e ureia foram semelhantes nos pacientes e controles. Taxa de filtração glomerular estimada e albuminúria foram significativamente diferentes entre pacientes e controles, porém semelhantes para os grupos SSHUe SS.

Observou-se um aumento na concentração de MCP-1 nos pacientes em relação ao grupo controle. Para o grupo SS o aumento foi significativo quando comparado ao grupo SSHU.

Os níveis de NOx pasmático e MDA urinário encontraram-se aumentados nos grupos SSHU e SS, havendo maior no grupo SS.

Os pacientes com haplótipo Bantu/Bantu apresentaram os maiores níveis de MCP-1, seguido do haplótipo Bantu/Benin e Benin/Benin

Houve uma correlação positiva entre MCP-1e contagem diferencial de monócitos, níveis de albumina urinária, proteinúria, MDA, NO^x e taxa de filtração glomerular.

REFERÊNCIAS

- ABO-ZENAH, H.; MOHARRAM, M.; EL NAHAS, A. M. Cardiorenal risk prevalence in sickle cell hemoglobinopathy. **Nephron Clin. Pract.**, v. 112, n. 2, p. c98-c106, 2009.
- ABUJAM, B.; CHEEKATLA, S. S.; AGGARWAL, A. Urinary CXCL-10/IP-10 and MCP-1 as markers to assess activity of lupus nephritis. **Lupus**, v. 22, p. 614–623, 2013.
- AHMED, S. G.; IBRAHIM, U. A. Haemoglobin-S in sickle trait with papillary necrosis. **Br. J. Hematol.**, v. 135, p. 415-416, 2006.
- ALVAREZ, O. M.; MILLER, S. T.; WANG, W. C.; LUO, Z.; MCCARVILLE, M. B.; SCHWARTZ, G. J.; THOMPSON, B.; HOWARD, T.; IYER, R. V.; RANA, S. R.; ROGERS, Z. R.; SARNAIK, S. A.; THORNBURG, C. D.; WARE, R. E. Effect of hydroxyurea treatment on renal function parameters: Results from the multi-center placebo-controlled baby hug clinical trial for infants with sickle cell anemia. **Pediatr. Blood Cancer**, v. 59, n. 4, p. 668-674, 2012.
- ALVAREZ, O.; ZILLERUELO, G.; WRIGHT, D.; MONTANE, B.; LOPEZ-MITNIK, G.. Serum cystatin c levels in children with sickle cell disease. **Pediatr. Nephrol.**, v. 21, n. 8, p. 533-537, 2006.
- ATAGA, K. I. O.; ORRINGER, E.P. Renal abnormalities in sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v. 63, n. 4, p. 205-211, 2000.
- AYGUN, B.; MORTIER, N.A.; SMELTZER, M.P.; HANKINS, J.S.; WARE, R.E. Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. **Pediatr. Nephrol.**, v. 26, n.8, p.1285-1290, 2011.
- AYGUN, B.; MORTIER, N. A.; SMELTZER, M. P.; SHULKIN, B. L.; HANKINS, J. S.; WARE, R. E. Hydroxyurea treatment decreases glomerular hyperfiltration in children with sickle cell anemia. **Am. J. Hematol.**, v.88, n.2, p.116-119,2013.
- BALLAS, S.K.; LIEFF, S.; BENJAMIN, L.J.; DAMPIER, C.D.; HEENEY, M.M.; HOPPE, C.; JOHNSON, C.S.; ROGERS, Z.R.; SMITH-WHITLEY, K.; WANG, W.C.; TELEN, M.J. Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am. J. Hematol.**, v.85, n. 1, p.6-13, 2010.
- BANDEIRA, F. M. G. C.; BEZERRA M. A. C.; SANTOS, M. N. N.; GOMES, Y. M.; ARAÚJO A. S.; ABATH, F. G. C. S. Importância dos programas de triagem para o gene da hemoglobina. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.
- BANK, N.; AYNEDJIAN, H.S.; QIU, J.H.; OSEI, S.Y.; AHIMA, R.S.; FABRY, M.E.;

NAGEL, R.L. Renal nitric oxide synthases in transgenic sickle cell mice. **Kidney Int.**, v. 50, p.184–189, 1996.

BASQUES, J. C. Especificações da Qualidade Analítica. **Labtest Diagnóstica**, 2005.

BELCHER, J. D.; BECKMAN, J. D.; BALLA, G.; BALLA, J.; VERCELLOTTI, G.; Heme degradation and vascular injury. **Antioxid. Redox Signal.**, v.12, p. 233–248, 2010

BELCHER, J. D.; MARKER, P. H.; WEBER, J. P.; HEBBEL, R. P.; VERCELLOTTI, G. M. Activated monocytes in sickle cell disease: potential role in the activation of vascular endothelium and vaso-occlusion. **Blood**, v. 96, p. 2451–2459, 2000.

BEUTLER, E. The common anemias: review. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 259, n. 16, p. 2433-2437, 1988.

BOLARINWA, R. A.; AKINLADE, K. S.; KUTI, M. A.; OLAWALE, O. O.; AKINOLA, N. O. Renal disease in adult Nigerians with sickle cell anemia: A report of prevalence, clinical features and risk factors. **Saudi J. Kidney Dis. Transpl.**, v. 23, n. 1, p. 171-175, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria GM/MS nº 1391, de 16 de agosto de 2005. Institui no âmbito do sistema único de saúde, as diretrizes para a política nacional de atenção integral às pessoas com doença falciforme e outras hemoglobinopatias. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 18 ago. 2005. Seção 1, p. 40.

Disponível em: < [http://](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2005/prt1391_16_08_2005.html)

bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2005/prt1391_16_08_2005.html>. Acesso em: 2 jan. 2014.

CANALLI, A. A. **Ação do óxido nítrico e da via dependente de Guanosina Monofosfato Cíclico nas propriedades adesivas de leucócitos de pacientes com anemia falciforme**. 2008. (Doutorado em Ciências Médicas) - Departamento de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

CANÇADO, R.D.; LOBO, C.; ÂNGULO, I.L.; ARAÚJO, P.I.C.; JESUS, J.A. Protocolo clínico e diretrizes terapêuticas para uso de hidroxiureia na doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v.31, n.5, p. 361-366, 2009 .

CARR, M.W.; ROTH, S.J.; LUTHER, E.; ROSE, S.S.; SPRINGER, T.A. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 9, p. 3652-3656, 1994.

CHANTRATHAMMACHART, P.; MACKMAN, N.; SPARKENBAUGH, E.; WANG, J.G.; PARISE, L.V.; KIRCHHOFER, D.; KEY, N.S.; PAWLINSKI, R. Tissue factor promotes activation of coagulation and inflammation in a mouse model of sickle cell disease. **Blood**, v.120, n. 3, p. 636-646, 2012.

CHARACHE, S. Treatment of sickling disorders. **Curr. Opin. Hematol.**, v. 3, n. 2, p. 139-144, 1996.

CHARO, I. F.; MYERS, S. J.; HERMAN, A.; FRANCI, C.; CONNOLLY, A. J.;

- COUGHLIN, S. R. Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 2752-2756, 1994.
- CHOW, F. Y.; NIKOLIC-PATERSON, D. J.; OZOLS, E.; ATKINS, R. C.; ROLLIN, B. J.; TESCH, G. H. Monocyte chemoattractant protein-1 promotes the development of diabetic renal injury in streptozotocin-treated mice. **Kidney Int.**, v. 69, n.1, p.73-80, 2006.
- CHOW, F.; OZOLS, E.; NIKOLIC-PATERSON, D.J.; ATKINS, R.C.; TESCH, G.H. Macrophages in mouse type 2 diabetic nephropathy: correlation with diabetic state and progressive renal injury. **Kidney Int.**, v. 65, n. 1, p. 116-128, 2004.
- COCKCROFT, D.W.; GAULT, M. H. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. **Nephron**, v. 16, p. 31-41, 1976
- COKIC, V. P.; ANDRIC, S. A.; STOJIKOVIC, S. S.; NOGUCHI, C. T.; SCHECHTER, A. N. Hydroxyurea nitrosylates and activates soluble guanylyl cyclase in human erythroid cells. **Blood**, v. 111, n. 3, p. 1117-1123, 2008.
- DAVID, J.M.; BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- DE SANTIS FELTRAN L, D. A. C. J.; SESSO, R. Renal complications of sickle cell disease: Managing for optimal outcomes. **Paediatr. Drugs**, v. 4, p. 29-36, 2002.
- DEVARAJAN, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease **Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.**, v. 241, p. 89–94, 2008.
- DIAS-DA-MOTTA P. M.; ARRUDA, V. R.; MUSCARÁ, M. N.; SAAD, S. T.; DE NUCCI, G.; COSTA, F. F.; CONDINO-NETO, A. The release of nitric oxide and superoxide anion by neutrophils and mononuclear cells from patients with sickle cell anemia. **Br. J. Haematol.**, v. 93, p. 333–340, 1996.
- DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.
- ELIAS, D. B.; ROCHA, L. B.; CAVALCANTE, M. B.; PEDROSA, A. M.; JUSTINO, I. C.; GONÇALVES, R. P. 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. 34, n. 4, p. 265-269, 2012.
- ELIAS, D.B.D.; FREITAS, R.M.; GONÇALVES, R.P.; MAGALHÃES, H.Y.F.; SOUSA, J. H.; MAGALHÃES, S. M. M. Evaluation of the concentration of malondialdehyde and nitrite in patients with sickle cell anemia with hydroxyurea treated or not. **Einstein**, v. 8, p. 414–418, 2010.
- FASSETT, R. G.; VENUTHURUPALLI, S. K.; GOBE, G. C.; COOMBES, J. S.; COOPER, M. A.; HOY, W. E. Biomarkers in chronic kidney disease: a review. **Kidney Int.**, v. 80, p. 806-821 2011.

FIGUEREIDO, M.S. Fatores moduladores da gravidade da evolução clínica da anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n.3, p. 215-217, 2007.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 46, n. 3, set. 2000.

GALIZA NETO, G. C.; PITOMBEIRA, M. S.; VIEIRA, H. F.; VIEIRA, M. L. C.; FARIAS, D. A. B. Análise dos haplótipos do gene da β S-globina no Ceará. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 41, n. 5, p. 315-321, 2005.

GANGEMI, S.; MALLAMACE, A.; MINCIULLO, P. L.; SANTORO, D.; MERENDINO, R. A.; SAVICA, V.; BELLINGHERI, G. Involvement of interleukin-18 in patients on maintenance haemodialysis. **Am. J. Nephrol.**, v. 22, n. 5/6, p. 417-421, 2002.

GANGEMI, S.; MALLAMACE, A.; MINCIULLO, P.L.; SANTORO, D.; MERENDINO, R.A.; SAVICA, V.; BELLINGHERI, G. Involvement of interleukin-18 in patients on maintenance haemodialysis. **Am. J. Nephrol.**, v. 22, n. 5, p. 417-421, 2002.

GLADWIN, M. T.; SHELHAMER, J. H.; OGNIBENE, F. P.; PEASE-FYE, M. E.; NICHOLS, J. S.; LINK, B.; DAKSESH, B. P.; MARCIN, A. J.; LEWIS, K. P.; SCHECHTER, A. N.; RODGERS, G. P. Nitric oxide donor properties of hydroxyurea in patients with sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 116, n. 2, p. 436-444, 2002.

GONZALEZ-MICHACA, L.; FARRUGIA, G.; CROATT, A. J.; ALAM, J.; NATH, K. A. Heme: A determinant of life and death in renal tubular epithelial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 286, p. F370-F377, 2004.

GOULART, M. O. F.; VASCONCELOS, S. M. L.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, M. S.; MANFREDINI, V.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007

GREEN, L. C.; de LUZURIAGA, K. R.; WAGNER, D. A.; RAND, W.; ISTFAN, N.; YOUNG, V. R.; TANNENBAUM, S. R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.78, p.7764-7768, 1981.

GUASCH, A. N. J.; NASS, K.; ZAYAS C. F. Glomerular involvement in adults with sickle cell hemoglobinopathies: Prevalence and clinical correlates of progressive renal failure **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 17, n. 8, p. 2228-2235, 2006.

GUASCH, A.; CUA, M.; MITCH, W.E. Early detection and the course of glomerular injury in patients with sickle cell anemia. **Kidney Int.**, v. 49, p.786-789, 1996.

HAYMANN, J. P.; STANKOVIC, K.; LEVY, P.; AVELLINO, V.; THARAUX, P. L.; LETAVERNIER, E.; GRATEAU, G.; BAUD, L.; GIROT, R.; LIONNET, F. Glomerular hyperfiltration in adult sickle cell anemia: a frequent hemolysis associated feature. **Clin. J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 5, n. 5, p. 756-756, 2010.

HOSTETTER, T. H. Hyperfiltration and glomerulosclerosis. **Semin. Nephrol.**, v. 23, p. 194-

199, 2003.

HUBANK, M. S. D. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. **Nucl. Acid Res.**, v. 22, p. 5640-5648, 1994.

HUNDEKAR, P. S.; SURYAKAR, A. N.; KARNIK, A. C.; KATKAM, R. V.; JOSHI, N. G.; GHONE, R. A. Level of nitric oxide and antioxidant vitamins in sickle cell anaemia patients. **Indian J. Physiol. Pharmacol.**, v. 56, n. 2, p.125-129, 2012.

INWALD, D. P. Platelet and leucocyte activation in childhood sickle cell disease: association with nocturnal hypoxaemia. **Br. J. Haematol.**, v. 111, p. 474–481 2000.

KADIRI, S. Chronic kidney disease: Sickle cell nephropathy as a likely cause. **Ann. Ibadan Postgraduate Med.**, p.4 -7, 2006.

KANAKIRIYA, S. K.; CROATT, A. J.; HAGGARD, J. J.; INGELFINGER, J. R.; TANG, S. S.; ALAM, J.; NATH, K. A. Heme: a novel inducer of MCP-1 through HO-dependent and HO-independent mechanisms. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 284, p. F546–F554, 2003.

KANAMORI, H.; MATSUBARA, T.; MIMA, A.; SUMI, E.; NAGAI, K.; TAKAHASHI, T.; ABE, H.; IEHARA, N.; FUKATSU, A.; OKAMOTO, H.; KITA, T.; DOI, T.; ARAI, H. Inhibition of MCP-1/CCR2 pathway ameliorates the development of diabetic nephropathy. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 360, n. 4, p. 772-777, 2007.

KIM, M. J.; TAM, F. W. Urinary monocyte chemoattractant protein-1 in renal disease. **Clin. Chim. Acta**, v. 20, n. 412, p. 2022-2030, 2011.

KOHAN, D. E. Production of endothelin-1 by rat mesangial cells: regulation by tumor necrosis factor. **J. Lab. Clin. Med.**, v.119, n.5, p. 477-484, 1992.

LEONARD, E. J.; YOSHIMURA, Y. T. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). **Immunol. Today**, v. 11, p. 97-101, 1990.

LEVEY, A. S.; STEVENS, L. A. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. **Ann. Intern. Med.**, v. 150, p. 604-612, 2009.

LIM, Y.C.; SNAPP, K.; KANSAS, G.S.; CAMPHAUSEN, H. R.; DING, F.W. LUSCINSKAS Important contributions of P-selectin glycoprotein ligand-1-mediated secondary capture to human monocyte adhesion to P-selectin, E-selectin, and TNF-alpha-activated endothelium under flow in vitro **J. Immunol.**, v.161, p. 2501–2508, 1998.

LOETSCHER, M.; GERBER, B.; LOETSCHER, P.; JONES, S. A.; PIALI, L.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B. Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. **J. Exp. Med.**, v. 184, n. 3, p. 963-969, 1996.

LUSTER, A. D. Chemokines: Chemotactic cytokines that mediate inflammation. **N. Eng. J. Med.**, v. 338, p. 436-445, 1998

- MAIER-REDELSPERGER, M.; LÉVY, P.; LIONNET, F.; STANKOVIC, K.; HAYMANN, J-P.; LEFÈVRE, G.; AVELLINO, V.; PEROL, J-P.; GIROT R, E. J.: Strong association between a new marker of hemolysis and glomerulopathy in sickle cell anemia. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 45, p. 289–292, 2010.
- MANUCHA, W. C. L.; RUETE, C.; MOLINA, H.; VALLÉS, P. Angiotensin II type I antagonist on oxidative stress and heat shock protein 70 (HSP 70) expression in obstructive nephropathy. **Cell Mol. Biol.**, v. 51, n. 6, p. 547-555, 2005.
- MARTINS, P. R. J.; MORAES-SOUZA, H.; SILVEIRA, T. B. Morbimortalidade em doença falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 5, 2010.
- MATSUMOTO, K. K.; KANMATSUSE K. Elevated interleukin-18 levels in the urine of nephrotic patients. **Nephron**, v. 88, n. 4, p. 334-339, 2001
- MELGAREJO, E.; MEDINA, MÁ.; SÁNCHEZ-JIMÉNEZ, F.; URDIALES, J.L. Monocyte chemoattractant protein-1: a key mediator in inflammatory processes. **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, p. 998–1001, 2009.
- MORI, K.; NAKAO, K. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. **Kidney Int.**, v. 71, n. 10, p. 967-970, 2007.
- NAOUM, P. C. **Hemoglobinopatias e talassemias**. São Paulo: Sarvier, 1997.
- NATH, K. A.; GRANDE, J. P.; HAGGARD, J. J.; CROATT, A. J.; KATUSIC, Z. S.; SOLOVEY, A.; HEBBEL, R. P. Oxidative stress and induction of heme oxygenase-1 in the kidney in sickle cell disease. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p. 893–903, 2001.
- NISHIHARA, K.; MASUDA, S.; SHINKE, H.; OZAWA, A.; ICHIMURA, T.; YONEZAWA, A.; NAKAGAWA, S.; INUI, K.; BONVENTRE, J.V.; MATSUBARA, K. Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. **Biochem. Pharmacol.**, v. 85, n. 4, p. 570-582, 2013.
- OKAMURA, H.; TSUTSI, H.; KOMATSU, T.; YUTSUDO, M.; HAKURA, A.; TANIMOTO, T.; TORIGOE, K.; OKURA, T.; NUKADA, Y.; HATTORI, K. et al. Cloning of a new cytokine that induces IFN- γ production by T cells. **Nature**, v. 378, n. 6552, p. 88-91, 1995.
- OZBEK, E. I. Induction of oxidative stress in kidney. **Int. J. Nephrol.**, Apr. 2012.
- PATHARE, A. K.; KINDI, S. A. L.; DAAR, S.; DENNISON, D. Cytokines in Sickle Cell Disease. **Hematology**, v. 8, n. 5, p. 329-337, 2003.
- PHAM, P. T. P.; PHAM, P.C; WILKINSON, A.H; LEW, S.Q. Renal abnormalities in sickle cell disease. **Kidney Int.**, v. 57, n. 1, p. 1-8, 2000.
- PLATT, O. S. B. Mortality in sickle cell disease: life expectancy and risk factors for early

death. **N. Eng. J. Med.**, v. 330, p. 1639-1644, 1994.

POWARS, D. R.; CHAN, L. S.; HITI, A.; RAMICONE, E.; JOHNSON, C. Outcome of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Medicine**, v. 84, n. 6, p. 363-376, 2005.

POWARS, D. R.; MEISELMAN, H. J.; FISHER, T. C.; HITI, A.; JOHNSON, C. Beta-S gene cluster haplotypes modulate hematologic and hemorheologic expression in sickle cell anemia: use in predicting clinical severity. **Am. J. Pediatr. Hematol. Oncol.**, v. 16, p. 55-61, 1994.

PRODJOSUDJADI, W.; GERRITSMA, J.S.; VAN, E.S.; DAHA, M.R.; BRUIJIN, J.A. Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. **Clin. Nephrol.**, v. 44, p. 148-155, 1995.

QUINN, C. T.; SHULL, E. P.; AHMED, N.; LEE, N. J. ; ROGERS, Z. R.; BUCHANAN, G. R.; Prognostic significance of early vaso-occlusive complications in children with sickle cell anemia. **Blood**, v. 109, p. 40-45, 2007.

RAYNAL, G. B. A.; TILLOU, X.; LIMANI, K.; PETIT, J. Les complications rénales de la drépanocytose. **Prog. Urol.**, v. 17, p. 794-795, 2007.

REITER, C.D.; WANG, X.; TANUS-SANTOS, J.E.; HOGG, N.; CANNON, R.O.; SCHECHTER, A.N.; GLADWIN, M.T.: Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. **Nat. Med.**, v. 8, p.1383–1389, 2002.

ROGERS, Z.R.; BUCHANAN, G.R.; Expanding the role of hydroxyurea in children with sickle cell disease. **J. Pediatr.**, v.145, n. 3, p. 287-288, 2004.

ROTHER, P. R.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M. T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, v. 293, n. 13, p. 1653-1662, 2005.

RYBICKI, A.C.; FABRY, M.E.; DOPES, M.D.; KAUL, D.K.; NAGEL, R.L.; Differential gene expression in the kidney of sickle cell transgenic mice: upregulated genes. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 31, p. 370-380, 2003.

SCHNOG, J. B.; ROJER, R.A.; GILLAVRY, M. R.; TEN CATE, H.; BRANDJES, D. P.; DUIJS, A. J. Steady-state sVCAM-1 serum levels in adults with sickle cell disease. **Ann. Hematol.**, v. 82, n. 2, p.109-113, 2003.

SCHNOUDER, R.L.; STRIETER, R.M.; KUNDEL, S. Interferon γ regulation of human cortical epithelial cell-derived monocyte chemoattractant peptide-1. *Kidney Int.*, v. 44, p. 43-49, 1993.

SELVARAJ, S. K.; GIRI, R. K.; PERELMAN, N.; JOHNSON, C.; MALIK, P.; KALRA, V. K. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. **Blood**, v. 102, p. 1515-1524, 2003.

SELVARAJ, S. K.; GIRI, R. K.; PERELMAN, N.; JOHNSON, C.; MALIK, P.; KALRA, V. K. Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by

placenta growth factor. **Blood**, v. 102, p. 1515-1524, 2003.

SERJEANT, G. R. **Sickle cell disease**. 3rd ed. Oxford: Oxford Medical Publications, 2001.

SESSO, R. A.; ALMEIDA, M.A.; FIGUEIREDO, M.S.; BORDIN, J.O. Renal dysfunction in patients with sickle cell trait. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 1257-1262, 1998.

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

SILVA, L.B.; GONCALVES, R.P. Características fenotípicas dos pacientes com anemia falciforme de acordo com os haplótipos do gene da β S-globina em Fortaleza, Ceará. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 32, n. 1, 2010 .

SILVA, M. C.; SHIMAUTI, E. L. T.; Eficácia e toxicidade da hidroxiuréia em crianças com anemia falciforme. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 2, p. 144-148, 2006.

SODRE, F. L.; COSTA, J. C. B.; LIMA, J. C. C. Evaluation of renal function and damage: a laboratorial challenge. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, 2007.

STEINBERG, M. H. Therapies to increase fetal hemoglobin in sickle cell disease. **Curr. Hematol. Rep.**, v. 2, n. 2, p. 95-101, 2003.

STRIETER, R. M.; WIGGINS, R.; PHAN, S. H.; WHARRAM, B. L.; SHOWELL, H. J.; REMICK, D. G.; CHENSUE, S. W.; KUNKEL, S. L. Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine-treated human fibroblasts and endothelial cells **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 162, p. 694-700, 1989.

STUART, M. J.; NAGEL, R. L. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 364, p. 1343-1360, 2004.

SUNDARAM, N. B.; BENNETT, M.; WILHELM, J.; KIM, M. O.; ATWEH, G.; DEVARAJAN, P.; MALIK, P. Biomarkers for early detection of sickle nephropathy. **Am. J. Hematol.**, v. 86, n. 7, p. 559-566, 2011.

SUNG, F. L.; ZHU, T. Y.; AU-YEUNG, K. K.; SIOW, Y. L.; O, K. Enhanced MCP-1 expression during ischemia/reperfusion injury is mediated by oxidative stress and NF-kappa- β . **Kidney Int.**, v. 62, n. 4, p. 1160-1170, 2002.

SWITZER, J. A. H.; HESS, D.C; NICHOLS, F.T.; ADAMS, R.J. Pathophysiology and treatment of stroke in sickle-cell disease: present and future. **Lancet Neurol.**, v. 5, n. 6, p. 501-512, 2006.

THARAUX, P. L.; HAGÈGE, I.; PLACIER, S.; VAYSSAIRAT, M.; KANFER, A.; GIROT, R.; DUSSAULE, J. C. Urinary endothelin-1 as a marker of renal damage in sickle cell disease. **Nephrol. Dial. Transplant.**, v. 20, p. 2408-2413, 2005.

TRACZ, M. J.; ALAM, J.; NATH, K. A. Physiology and pathophysiology of heme: implications for kidney disease. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 18, p. 414-420, 2007.

- TSARAS, G. O. A.; OWUSU-ANSAH, A.; BOATENG, F.O.; AMOATENG-ADJEPONG, Y. Complications associated with sickle cell trait: a brief narrative review. **Am. J. Med.**, v. 122, p. 507-512, 2009.
- URBSCHAT, A.; OBERMÜLLER, N.; HAFERKA, M.P.A. Biomarkers of kidney injury. **Biomarkers**, v. 16, n.1, p. 22-30, 2011.
- VALENTE, A. J.; GRAVES, D. T.; VIALLE-VALENTIN, C. E.; DELGADO, R.; SCHWARTZ, C. J. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. **Biochemistry**, v. 27, p. 4162-4168, 1988.
- WADA, T.; YOKOYAMA, H.; SU, S.B. *et al.* Monitoring urinary levels of monocyte chemotactic and activating factor reflects disease activity of lupus nephritis. **Kidney Int.**, v.49, p.761-767, 1996.
- WADA, T. F.; FURUICHI, K.; SAKAI, N. Up-regulation of monocyte chemoattractant protein-1 in tubulointerstitial lesions of human diabetic nephropathy. **Kidney Int.**, v. 58, p. 1492-1499, 2000.
- WESSON, D. E. The initiation and progression of sickle cell nephropathy. **Kidney Int.**, v. 61, n. 6, p. 2277-2286, 2002.
- WESTGARD, J. O.; BARRY, P. L.; HUNT, M. R. A multi-rule Shewhart chart for quality control in clinical chemistry. **Clin. Chem.**, v. 27, p. 493-501, 1981.
- WINTROBE, M. M.; LEE, G. R. **Wintrobe's**: clinical hematology. St Louis: MD Consult, 1999.
- WOOD, K. C.; GRANGER, D. N. Sickle cell disease: Role of reactive oxygen and nitrogen metabolites. **Clin. Exp. Pharmacol.**, v. 34, p. 926-932, 2007.
- WOOD, K. C.; HSU, L.L.; GLADWIN, M. T. Sickle cell disease vasculopathy: A state of nitric oxide resistance. **Free Rad. Biol. Méd.**, v. 44, p. 1506-1528, 2008.
- ZAGO, M. A. P.; PINTO, A. C. S. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 3, p. 207-214, 2007.
- ZELMNOVITZ, T.; GROSS, J. L.; OLIVEIRA, J. L.; PAGGI, A.; TATSCHI, M.; AZEVEDO, M. J. The receiver operating characteristics curve in the evaluation of a random urine specimen as a screening test for diabetic nephropathy. **Diabetics Care**, v. 20, p. 516-519, 1997
- ZENNADI, R. A.; CHIEN, K.; XU, M.; BATCHVAROVA, M.; TELEN, J. Sickle red cells induce adhesion of lymphocytes and monocytes to endothelium. **Blood**, v.112, p. 3474-3483, 2008.

APÊNDICE A – QUESTIONÁRIO DE COLETA DE DADOS

IDENTIFICAÇÃO

Nome completo: _____

Sexo: () Feminino () Masculino

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____

Telefone residencial: () _____

Etnia: pardo () negro () branco ()

Data	Hb (g/dL)	Ht (%)	Leucócitos (/mm ³)	Neutrófilos (/mm ³)	Linfócitos (/mm ³)	Monócitos (/mm ³)	Plaquetas (/mm ³)
Hidroxiuréia	Ur (mg/dL)	Cr (mg/dL)	Ferritina (ng/mL)				

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa intitulado **“Uso da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) como biomarcador de lesão renal precoce**

em pacientes com anemia falciforme em Fortaleza-Ceará” que tem por objetivo investigar a ocorrência de alterações nos rins de indivíduos com anemia falciforme.

O funcionamento dos seus rins será avaliado através de alguns testes e para isso será necessária a coleta de pequena amostra de urina.

O benefício que poderá ser obtido através desta pesquisa é a descoberta de anormalidades no funcionamento de seus rins, sendo conseqüentemente oferecido o tratamento adequado pelo Serviço de Nefrologia do Hospital Universitário Walter Cantídio. Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem prejuízo para seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente, e a qualquer momento você poderá ter acesso aos resultados e benefícios encontrados na pesquisa. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Os pesquisadores se comprometem a utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas.

O principal investigador é a mestrande **Talyta Ellen de Jesus dos Santos**. Você pode entrar em contato pelo telefone (85) 3366-8264. E-mail: ellenj_08@yahoo.com.br. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o **Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HUWC** – Rua Capitão Francisco Pedro 1290, Rodolfo Teófilo; fone: 3366-8589 – E-mail: cephuwc@huwc.ufc.br. Caso você se sinta suficientemente informado a respeito das informações que leu ou que foram lidas para você sobre os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes e que sua participação é voluntária, que não há remuneração para participar do estudo e se você concordar em participar solicitamos que assine no espaço abaixo. O sr. (a) ficará com uma via deste termo, e outra via ficará com o investigador responsável pela pesquisa.

Assinatura do paciente/representante

Data ____ / ____ / ____

Assinatura do pesquisador

Data ____ / ____ / ____

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Uso da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) como biomarcador de lesão renal precoce em pacientes com anemia falciforme em Fortaleza-Ceará

Pesquisador: Talyta Ellen de Jesus dos Santos

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 07240313.3.0000.5045

Instituição Proponente: Universidade Federal do Ceará/HOSPITAL UNIVERSITARIO WALTER

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 291.693

Data da Relatoria: 03/06/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa a ser executado junto ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará (UFC), nível mestrado. O estudo é do tipo transversal, observacional e analítico. Envolve pacientes adultos com diagnóstico molecular de Anemia Falciforme (AF) caracterizados pelo grupo do Laboratório de Pesquisa em Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas (LPHDGH) da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE)/UFC. Serão utilizadas informações laboratoriais dos pacientes por meio do prontuário dos assistidos, bem como, pela análise de amostra de urina a ser coletada durante a execução da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Avaliar o uso da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) como marcador de lesão renal precoce em pacientes adultos com AF em acompanhamento no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC)/UFC.

Específicos: Avaliar o perfil hematológico dos pacientes em estudo; Mensurar os níveis de MCP-1 nos pacientes com AF; Associar os haplótipos do gene da beta globina com os níveis de MCP-1; Associar os níveis de MCP-1 com parâmetros bioquímicos e hematológicos, marcadores de função

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: Rodolfo Teófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 **Fax:** (853)281.-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
WALTER CANTÍDIO/
UNIVERSIDADE FEDERAL DO



Continuação do Parecer: 291.693

renal empregados na rotina do serviço; Avaliar os níveis de MCP-1 em função do uso de HU; Associar os níveis de MCP-1 com os níveis de óxido nítrico nos pacientes; Avaliar a função renal nos pacientes em estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisadora refere riscos mínimos. No entanto foi observada a possível incidência dos seguintes riscos: descarte inadequado do material biológico e exposição das informações clínicas dos pacientes.

Benefícios: Descoberta de anormalidades no funcionamento dos rins dos sujeitos da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo envolverá busca de informações no prontuário dos sujeitos do estudo bem como a análise de amostra de urina de 50 pacientes portadores de AF e 30 indivíduos saudáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE: foram atendidas as recomendações do CEP/HUWC

Folha de rosto: foi atendida a recomendação do CEP

O cronograma foi atualizado, condicionando o início da execução da pesquisa com a disponibilidade do parecer favorável deste (CEP/HUWC).

Os demais termos obrigatórios estão adequados.

Recomendações:

Sem mais recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto adequado para execução, sob o prisma Ético.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Rua Capitão Francisco Pedro, nº 1290
Bairro: RodolfoTeófilo **CEP:** 60.430-370
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (853)366.-8613 **Fax:** (853)281.-4961 **E-mail:** cephuwc@huwc.ufc.br