

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

Fabiola Gomes Mendes

Avaliação de marcadores do estresse oxidativo na nefropatia
falciforme em crianças com anemia falciforme do Estado de
Minas Gerais

Belo Horizonte

2022

Fabiola Gomes Mendes

Avaliação de marcadores do estresse oxidativo na nefropatia falciforme em crianças com anemia falciforme do Estado de Minas Gerais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Professora Dra. Ana Cristina Simões e Silva

Coorientador: Dr. André Rolim Belisário

Belo Horizonte

2022

Mendes, Fabiola Gomes.

M538a Avaliação de marcadores do Estresse Oxidativo na Nefropatia Falciforme em crianças com Anemia Falciforme do Estado de Minas Gerais [manuscrito]. / Fabiola Gomes Mendes. - - Belo Horizonte: 2022. 55f.: il.

Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.
Coorientador (a): André Rolim Belisário.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Estresse Oxidativo. 2. Anemia Falciforme. 3. Nefropatias. 4. Superóxido Dismutase. 5. Glutathione Peroxidase. 6. Dissertação Acadêmica. I. Silva, Ana Cristina Simões e. II. Belisário, André Rolim. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 160



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DE MARCADORES DO ESTRESSE OXIDATIVO NA NEFROPATIA FALCIFORME EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME DO ESTADO DE MINAS GERAIS

FABÍOLA GOMES MENDES

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia dois de junho de dois mil vinte e dois, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Ana Cristina Simões e Silva – Orientadora
UFMG

André Rolim Belisário - Coorientador
HEMOMINAS

Eduardo Araújo de Oliveira
UFMG

Célia Maria da Silva
HEMOMINAS

Belo Horizonte, 02 de junho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Eduardo Araujo de Oliveira, Membro**, em 02/06/2022, às 13:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Cristina Simoes e Silva, Presidente de comissão**, em 02/06/2022, às 13:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **André Rolim Belisário, Usuário Externo**, em 02/06/2022, às 22:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Célia Maria da Silva, Usuário Externo**, em 03/06/2022, às 08:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1491271** e o código CRC **F244B013**.

Aos pacientes com Nefropatia Falciforme, que esse trabalho possa de alguma forma ajudar na melhor compreensão da doença e conceder melhor qualidade de vida.

Ao Lucas, meu amado esposo, por todo incentivo, atenção e compreensão.

A Valentina, minha filha, que inspira e alegra todos os meus dias sejam eles fáceis ou difíceis.

A minha mãe que esteve sempre ao meu lado, me apoiando a todo instante.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar, por me capacitar, abençoar e guiar nessa jornada.

A todos os pacientes, aos que aqui se encontram e aos que se foram, sem eles nada disso teria acontecido. Deixo a todos eles meu muito obrigada!

A minha Professora Ana Cristina Simões e Silva pela oportunidade de ter sido orientada por ela. Uma pessoa solícita, humana com quem aprendi muito, tanto profissional quanto pessoalmente. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, André Rolim Belisário, que me deu umas das oportunidades mais importantes da minha vida, ao me aceitar como bolsista de iniciação científica. Onde aprendi tudo que sei e me deu base para aprender outras coisas. Por aceitar me coorientar e ter me ajudado em vários aspectos do meu mestrado, cooperando com meu crescimento como pessoa e profissional, muito obrigada!

Ao meu amado esposo Lucas que esteve sempre ao meu lado, me ajudou em tudo o que precisei. Apoiou-me em todos os momentos e sempre me incentivou a estudar e alcançar meus objetivos. Te amo!

A minha filha Valentina que me ensinou muito e tem me ensinado em vários aspectos da minha vida, sendo um desafio diário. Te amo minha pequena.

A minha mãe Margarida que é uma inspiração de ser humano para mim, sempre presente me incentivando apoiando e me proporcionando paz nos meus momentos de ansiedade. Obrigada por tudo mãe, principalmente por estar sempre comigo. Te amo.

Aos meus amigos da fundação Hemominas, em especial Larissa que sempre pude contar. Agradeço a Rahyssa por toda ajuda e conhecimento cedido. Aos amigos do laboratório LIIM, em especial Roberta por todos os conselhos e ajuda. A Jéssica por me acompanhar nessa jornada. E a todos os meus amigos que fiz por aí (de infância, do grupo Pardini, da faculdade), que de alguma forma me ajudaram e me proporcionaram momentos de alegria. Meu muito obrigada a todos!!

Agradeço todas as instituições de fomento, CAPES pela minha bolsa, UFMG e Fundação Hemominas pela estrutura e captação de pacientes, laboratório LIIM onde realizei meus experimentos, ao programa de Medicina Molecular pela ajuda com as sondas. Esse projeto foi

financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG; # APQ-00131-17 e APQ-04261-17) a quem sou muito grata. Agradeço a todos que ajudaram de alguma forma na realização desse projeto.

“O que realmente importa na vida é o que se faz com o tempo que nos é dado”

O Senhor dos Anéis — J. R. R. T

“Não existe triunfo sem perda, não há vitória sem sofrimento, não há liberdade sem sacrifício”

O Senhor dos Anéis — J. R. R. T

RESUMO

Introdução: A doença falciforme (DF) é uma desordem genética muito comum no Brasil e no mundo, caracterizada pela presença da hemoglobina S nas hemácias. A anemia falciforme (AF) é a forma mais grave dentre as DF. Sua principal característica é a mudança da conformidade das hemácias do formato normal para o de foice, resultando em anemia hemolítica crônica e episódios vaso-oclusivos. Os pacientes com AF são acometidos por diversas manifestações clínicas, como, por exemplo, alterações nos rins. A fisiopatologia da nefropatia falciforme (NF) não é muito bem compreendida. As primeiras manifestações ocorrem na infância, incluindo a hipostenúria, a hiperfiltração glomerular e albuminúria. A ativação de mediadores inflamatórios, lesão endotelial e aumento da expressão de moléculas de adesão podem ocorrer em decorrência do estresse oxidativo, que é considerado um fator de modulação da gravidade da DF e, provavelmente, da NF. O objetivo do estudo foi avaliar a influência de marcadores de estresse oxidativo na ocorrência de albuminúria em pacientes pediátricos com AF. **Pacientes e Métodos:** Trata-se de um estudo transversal realizado em uma coorte de pacientes pediátricos com DF, triados pelo programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) e acompanhados no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. Foram realizadas genotipagem do polimorfismo rs4880 por PCR em tempo real e dosagem da atividade enzimática da glutathiona peroxidase (GPX) por teste colorimétrico em amostras de urina. As variáveis resposta avaliadas foram a albuminúria e albuminúria persistente, como variáveis dicotômicas (presente e ausente). Variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartilico. A distribuição normal das variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de Student não pareado ou teste U de Mann-Whitney. As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas usando qui-quadrado bicaudal ou teste exato de Fisher. A análise multivariada foi feita utilizando a regressão logística. **Resultados:** A população de estudo consistiu em 344 pacientes com DF, sendo 163 do sexo feminino e 181 do sexo masculino. Em relação ao tratamento, 203 (59%) pacientes albuminúria usavam hidroxiureia (HU), 31 (9%) HU e regime de transfusão crônica, 3 (0,8%) regime de transfusão crônica e 107 (31,1%) não faziam uso dessas modalidades terapêuticas. Dos 344 participantes, 87 (25,3%) apresentavam albuminúria e 32 (9,3%) apresentavam albuminúria persistente. Em relação ao polimorfismo rs4880, 88 (25,6%) apresentaram o genótipo TT, 187 (54,4%) o genótipo TC e 69 (20,1%) o genótipo CC, porém, sem diferenças significativas entre os grupos com e sem albuminúria ou albuminúria persistente. A atividade da enzima GPX foi mensurada em amostras de 120 pacientes, sendo 60 do sexo feminino e 60 do sexo masculino. Oitenta pacientes (66,7%) apresentavam albuminúria e 32 (26,7%) apresentavam albuminúria persistente. Não houve associação entre sexo, idade, terapia em uso e atividade da enzima GPX. A atividade da enzima GPX foi menor nos participantes com albuminúria persistente, entretanto a diferença não foi significativa. Não houve correlação entre a relação albumina/creatinina na urina e a atividade da enzima GPX. Na análise multivariada, apenas a idade se manteve no modelo final. **Conclusão:** Não houve diferenças significativas na frequência dos genótipos do polimorfismo estudado em relação à presença ou não da albuminúria. Além disso, não foram detectadas diferenças significativas na atividade da enzima GXP nas amostras de urina em relação à presença ou não da albuminúria.

Palavras-chave: Doença falciforme, anemia falciforme, nefropatia falciforme, estresse oxidativo, superóxido dismutase, glutathiona peroxidase

ABSTRACT

Introduction: Sickle cell disease (SCD) is a very common genetic disorder in Brazil and worldwide, characterized by the presence of hemoglobin S in red blood cells. Sickle cell anemia (SCA) is the most severe form of SCD. Its main feature is the change in red blood cell conformity from normal to sickle shape, resulting in chronic hemolytic anemia and vaso-occlusive episodes. Patients with FA are affected by several clinical manifestations, such as, for example, changes in the kidneys. The pathophysiology of sickle cell nephropathy (SNF) is not very well understood. The first manifestations occur in childhood, including hyposthenuria, glomerular hyperfiltration and albuminuria. Activation of inflammatory mediators, endothelial injury and increased expression of adhesion molecules may occur because of oxidative stress, which is considered a factor in modulating the severity of SCD and, probably, NF. The aim of the study was to evaluate the influence of oxidative stress markers on the occurrence of albuminuria in pediatric patients with SCA. **Patients and Methods:** This is a cross-sectional study carried out in a cohort of pediatric patients with SCD, screened by the Neonatal Screening Program of Minas Gerais (PTN-MG) and followed up at the Hemocentro de Belo Horizonte of Fundação Hemominas. Genotyping of the rs4880 polymorphism was performed by real-time PCR and measurement of the enzymatic activity of glutathione peroxidase (GPX) by colorimetric test in urine samples. The response variables evaluated were albuminuria and persistent albuminuria, as dichotomous variables (present and absent). Continuous variables were expressed as mean and standard deviation (SD) or median and interquartile range. The normal distribution of continuous variables was verified by the Kolmogorov-Smirnov test. Continuous variables were compared using the unpaired Student's t test or the Mann-Whitney U test. Associations between categorical variables were assessed using two-tailed chi-square or Fisher's exact test. Multivariate analysis was performed using logistic regression. **Results:** The study population consisted of 344 patients with SCD, 163 female and 181 male. Regarding treatment, 203 (59%) albuminuria patients used hydroxyurea (HU), 31 (9%) HU and chronic transfusion regimen, 3 (0.8%) chronic transfusion regimen and 107 (31.1%) did not made use of these therapeutic modalities. Of the 344 participants, 87 (25.3%) had albuminuria and 32 (9.3%) had persistent albuminuria. Regarding the rs4880 polymorphism, 88 (25.6%) presented the TT genotype, 187 (54.4%) the TC genotype and 69 (20.1%) the CC genotype, however, without significant differences between the groups with and no albuminuria or persistent albuminuria. GPX enzyme activity was measured in samples from 120 patients, 60 females and 60 males. Eighty patients (66.7%) had albuminuria and 32 (26.7%) had persistent albuminuria. There was no association between sex, age, therapy in use and GPX enzyme activity. GPX enzyme activity was lower in participants with persistent albuminuria, however the difference was not significant. There was no correlation between the albumin/creatinine ratio in urine and the activity of the GPX enzyme. In the multivariate analysis, only age remained in the final model. **Conclusion:** There were no significant differences in the frequency of the genotypes of the polymorphism studied in relation to the presence or absence of albuminuria. In addition, no significant differences were detected in the activity of the GXP enzyme in the urine samples in relation to the presence or absence of albuminuria.

Key words: Sickle cell disease, sickle cell anemia, sickle cell nephropathy, oxidative stress, superoxide dismutase, glutathione peroxidase

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Características demográficas dos participantes do estudo de acordo com a ocorrência de albuminúria	34
Tabela 2 - Frequência do polimorfismo rs4880 na população de acordo com a ocorrência de albuminúria	35
Tabela 3 - Frequência do polimorfismo rs4880 na população de acordo com a ocorrência de albuminúria persistente	35
Tabela 4 - Comparação da atividade da enzima glutathione peroxidase em pacientes pediátricos com Anemia Falciforme de acordo com a presença ou não de albuminúria.....	36
Tabela 5 – Análise multivariada dos fatores associados a albuminúria e albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais	37
Gráfico 1: Atividade enzimática glutathione peroxidase expressa em pacientes pediátricos com anemia falciforme de acordo com o sexo	36

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Incidência de nascidos vivos diagnosticados com DF em alguns estados que realizam a triagem neonatal	16
Figura 2: Probabilidade de doença falciforme em caso de heterozigose para o alelo β^S nos pais	17
Figura 3: Esquema representando a fisiopatologia da anemia falciforme	18
Figura 4: Caracterização das manifestações clínicas e complicações da anemia falciforme	20
Figura 5: Algoritmo que mostra a sequência de eventos relacionados à nefropatia falciforme	22
Figura 6: Fisiopatologia da nefropatia falciforme alguns processos que influenciam no início e progressão da doença	23
Figura 7: Esquema representando a fisiopatologia da nefropatia falciforme	24
Figura 8: Fluxograma de seleção dos pacientes, com divisão dos experimentos realizados	29

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AF - Anemia falciforme

DF - Doença falciforme

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DRC - Doença renal crônica

DRCT - Doença renal crônica terminal

EROs - Espécies reativas de oxigênio

GXP - glutationa peroxidase

Hb - Hemoglobina

Hb A - Hemoglobina do adulto

Hb C - hemoglobina C

Hb D - hemoglobina D

Hb F - Hemoglobina F

Hb S - hemoglobina S

Hb SS - Homozigossidade para o alelo S

HBB - Betaglobina

HTX - Transfusão

HU - Hidroxiureia

NO - Óxido nítrico

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

PTN-MG - programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

SOD - Superóxido dismutase

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TFG - Taxa de filtração glomerular

β-tal - Beta Talassemia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Anemia Falciforme	16
2.2 Nefropatia Falciforme	21
2.3 Estresse Oxidativo	25
2.3.1 Estresse oxidativo na anemia falciforme	25
3. OBJETIVOS.....	28
3.1 Objetivo geral	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
4.1 Delineamento do estudo e caracterização da amostra	29
4.2 Casuística	29
4.3 Critérios de inclusão.....	30
4.4 Critérios de exclusão	30
4.5 Variável resposta	30
4.6 Variáveis explicativas	31
4.6.1 Variáveis Genéticas	31
4.6.2 Dosagem da atividade enzimática da Glutathiona Peroxidase	32
4.7 Análises estatísticas.....	32
4.8 Considerações éticas.....	33
5. RESULTADOS	34
5.1 População do estudo.....	34
5.2 Análise da associação entre o polimorfismo SOD2 e a ocorrência de albuminúria.....	34
5.3 Análise da associação entre a atividade enzima GXP e a ocorrência de albuminúria.....	35
5.4 Análise multivariada	37
6. DISCUSSÃO.....	38
7. CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
ANEXOS.....	54

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A doença falciforme (DF) é uma desordem genética muito comum no Brasil e no mundo, caracterizada pela produção da hemoglobina S nas hemácias. O termo DF engloba vários genótipos, incluindo a associação de outras hemoglobinas anormais com a hemoglobina S como, por exemplo, Hb S β -talassemias, Hb SC, Hb SD e Hb SE e anemia falciforme. A anemia falciforme (AF), genótipo homocigoto (Hb SS), é considerada a forma mais grave dentre as DF. A AF se caracteriza pela alteração da forma das hemácias, que, em determinadas situações, passam do formato normal para o formato de foice (1-5). A mudança do formato da hemácia resulta em anemia hemolítica crônica e episódios vaso-oclusivos agudos (1, 6, 7).

Algumas teorias indicam que o surgimento do alelo β^S ocorreu na África ou Ásia, introduzido no Brasil no período colonial pelo tráfico de negros escravizados. Acredita-se que a origem da AF se deu em resposta à pressão seletiva exercida pela malária, que é endêmica na mesma região de surgimento da AF (1-5).

A variação da gravidade clínica da DF se dá por alguns fatores conhecidos, tais como o genótipo, níveis de hemoglobina fetal, coherença de talassemia alfa e fatores socioeconômicos. A nefropatia falciforme (NF) é uma das manifestações clínicas da DF, atingindo cerca de 1/3 da população de crianças e adolescentes, apresentando alta mortalidade quando evolui para estágio de doença renal crônica terminal (DRCT) (3-5).

Dados da literatura científica sugerem que o estresse oxidativo é um fator modulador da gravidade da AF (6-9). A maioria dos dados disponíveis na literatura são oriundos de outros países, possuem reduzido tamanho amostral e, na maioria das vezes, incluem apenas a população adulta (6-8, 10). Estudos recentes sugerem que o estresse oxidativo é um modulador na gravidade da nefropatia diabética, condição que apresenta fisiopatologia semelhante da NF (10, 11).

Identificar se o estresse oxidativo contribui para a ocorrência e gravidade da NF em pacientes pediátricos pode gerar informações úteis sobre a fisiopatologia da doença e auxiliar no desenvolvimento de possíveis modalidades de tratamentos e alvos farmacológicos. Além disso, as informações e resultados gerados pelo estudo podem ajudar a identificar crianças e adolescentes com maior risco de complicações graves, sendo, portanto, úteis no manejo clínico dos pacientes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anemia Falciforme

As doenças falciformes são um conjunto de doenças genéticas mais comuns no Brasil e no mundo sendo caracterizadas pela presença de pelo menos um alelo β^S (11-14). A AF é uma doença hereditária autossômica recessiva caracterizada pela presença do alelo β^S em homozigose (Figura 2). No Brasil, o alelo β^S possui uma distribuição bastante heterogênea no País, com maior prevalência em alguns estados como o da Bahia, Rio de Janeiro e Minas Gerais, tornando-se assim um problema de saúde pública (Figura 1) (7, 11, 14).

Estados	Incidência
Bahia	1:650
Rio de Janeiro	1:1.300
Pernambuco, Maranhão, Minas Gerais e Goiás	1:1.400
Espírito Santo	1:1.800
São Paulo	1:4.000
Rio Grande do Sul	1:11.000
Santa Catarina e Paraná	1:13.500

Figura 1: Incidência de nascidos vivos diagnosticados com doença falciforme em estados que realizam a triagem neonatal.

Programas estaduais de Triagem Neonatal; Fonte: Ministério da saúde do Brasil, 2013.

https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/doenca_falciforme_condutas_basicas_tratamento.pdf

A hemoglobina (Hb) é uma proteína tetramérica e em sua composição existem diferentes associações de subunidades da globina ligadas ao cofator heme. Cada uma dessas subunidades pode transportar uma molécula de oxigênio. A Hb A é composta por dois tipos de unidades, duas cadeias α -globina e duas cadeias β -globina (6, 12, 14, 15).

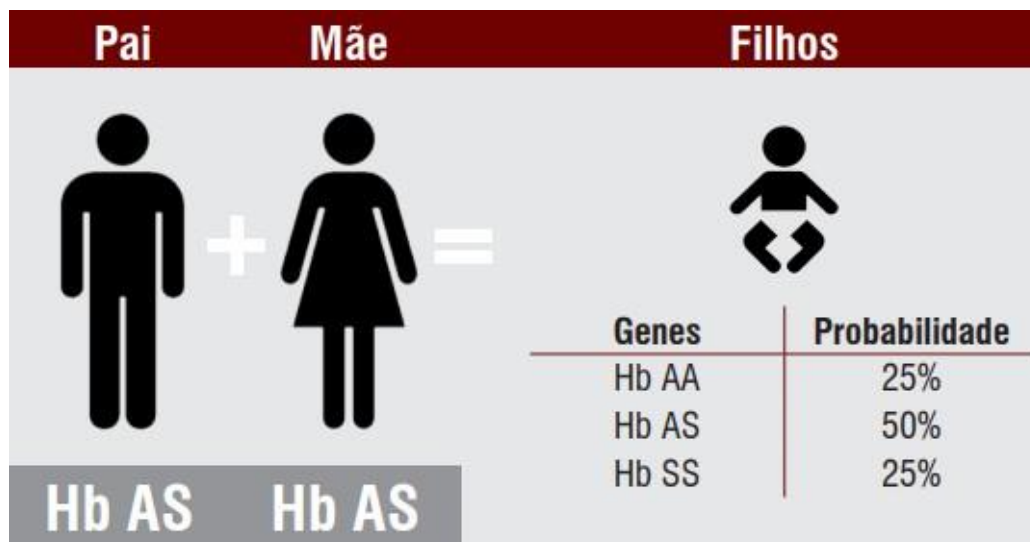


Figura 2: Probabilidade de doença falciforme em caso de heterozigose para o alelo β^S nos pais.

Fonte: Ministério da saúde do Brasil, 2015.

https://telelab.aids.gov.br/moodle/pluginfile.php/39506/mod_resource/content/4/Doenca%20Falciforme_SEM.pdf

O gene *HBB*, localizado no braço curto do cromossomo 11, é responsável pela síntese das cadeias β globínicas. A mutação de ponto no 6º códon do *exon* 1 do gene *HBB* promove a substituição da base timina pela base adenina, determinando a troca do aminoácido ácido glutâmico por valina ($\beta^6\text{Glu-Val}$). Tal substituição acarreta na produção de uma Hb variante, a Hb S, que possui características distintas da Hb A (Figura 3) (7, 12, 16).

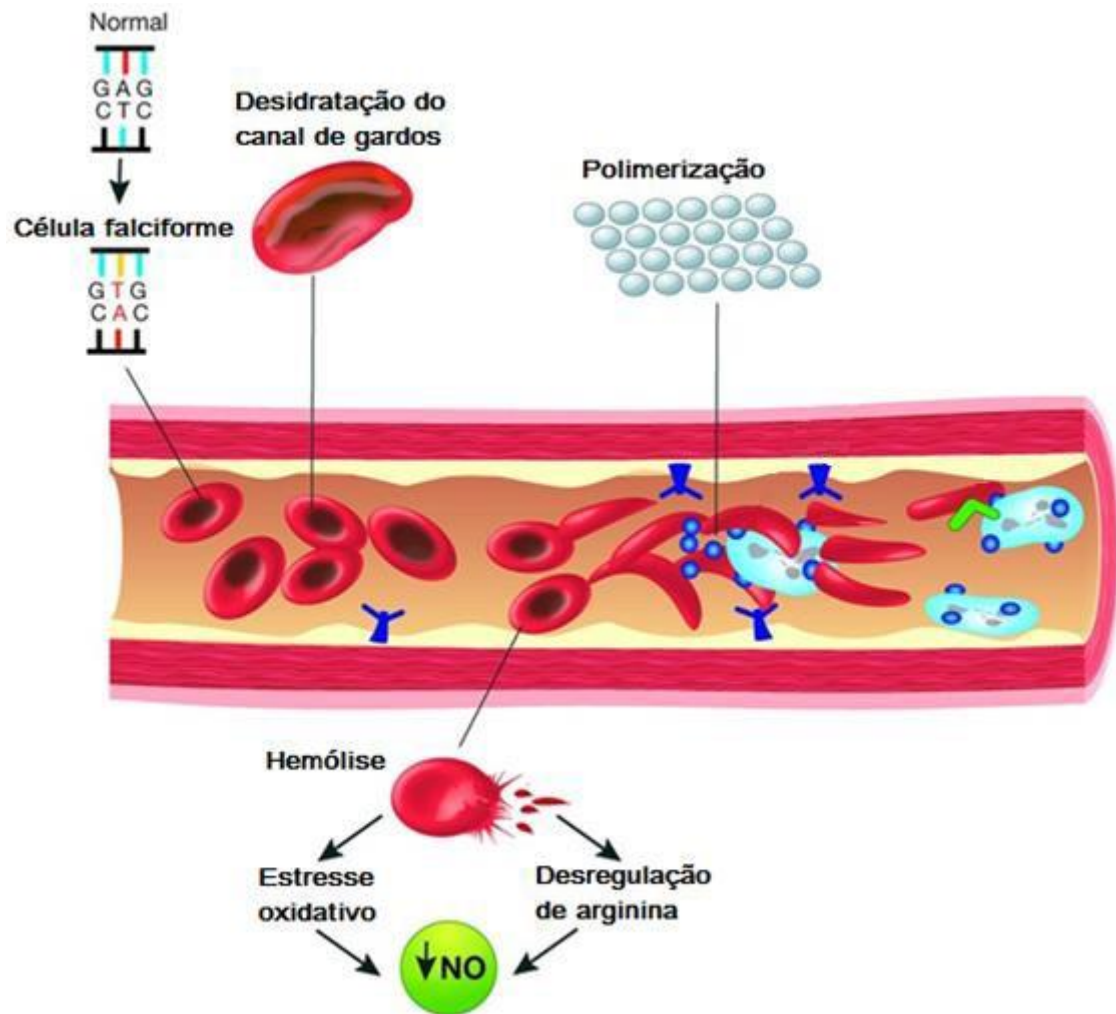


Figura 3: Fisiopatologia da anemia falciforme. Devido a recorrentes ciclos de polimerização e despolimerização, as hemácias se rompem, liberando hemoglobina livre no vaso. Todo esse processo estimula a resposta inflamatória, causando desregulação da arginina, redução das concentrações e consumo de óxido nítrico, e estresse oxidativo. Adaptado de Gardner., Ochsner J, 2018. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6292457>

Hemácias falciformes são extremamente instáveis, tendo sua vida útil reduzida em cerca de 75%. A conformidade da hemácia muda drasticamente quando em estado de hipóxia, pois a Hb S sofre polimerização acarretando mudança da forma das hemácias que adquirem aspecto de foice. As hemácias falciformes apresentam propensão à adesão ao endotélio (1, 2, 3, 7). Tal fenômeno ocorre em decorrência da ativação das células endoteliais provavelmente por contato direto com Hb livre, hemácias falciformes, espécies reativas de oxigênio (EROs) e heme. A maior concentração local desses componentes é induzida pela hipóxia. Além disso, há menor disponibilidade local de óxido nítrico (NO) que acarreta expressão de moléculas de adesão (como VCAM,

ICAM1, antígeno de superfície de leucócito CD47, integrina $\alpha V\beta 3$, E-selectina, P-selectina) e a produção de endotelina 1 (1, 3). Ressalta-se que há redução de uma substância vasodilatadora, o NO em paralelo ao aumento de uma molécula vasoconstrictora, a endotelina 1 (1, 2, 3, 17).

As hemácias falciformes ficam mais rígidas e aderentes, favorecendo a interação com outras hemácias, leucócitos, plaquetas e o endotélio. Essa interação causa fenômenos vaso-oclusivos na microvasculatura, que ocasionam lesões por isquemia e reperfusão tecidual. Células falciformes tendem a sofrer desidratação, que facilita a mudança da sua conformação. Todos os glóbulos vermelhos de pessoas com ou sem AF contém proteínas do canal da Gardos, que é um importante regulador de volume celular. Em pacientes com AF tem-se um acúmulo excessivo de cálcio, e esse canal funciona como uma bomba de proteína. Quando ativado pelo cálcio o canal de Gardos excreta potássio intracelular, acarretando uma grande perda de líquido e de cálcio. Isso leva a uma alta concentração de hemoglobina intracelular, e em consequência a polimerização da Hb S desoxigenada. (1, 2, 3, 12).

A disfunção do endotélio vascular é uma das complicações mais comuns da AF. Essa disfunção endotelial é ocasionada pela hemólise intravascular que libera grandes quantidades de Hb livre na circulação, gerando lesão na parede do vaso e ativação das células endoteliais. Em consequência, há ativação de intensa resposta inflamatória e adesão das células à parede do endotélio. Esse processo tem como fatores causais a baixa biodisponibilidade de NO e arginina em associação com a produção de superóxido, redução de trifosfato de adenosina e da capacidade antioxidante, lesões de isquemia e reperfusão e estresse oxidativo (1-5, 12, 18).

Como consequências do estresse oxidativo, a formação de micropartículas e o aumento da exposição à fosfatidilserina promovem atividade pró-coagulante da própria hemácia. Em decorrência da desorganização da bicamada lipídica da membrana da hemácia, a fosfatidilserina que normalmente predomina na camada interna tende a se movimentar para a camada externa, intensificando assim os fenômenos de tromboembolismo da AF (3, 12, 18).

A enzima arginase-1 é de extrema importância para produção do NO em pacientes com AF. Altas taxas de hemólise comprometem a capacidade de produção de NO pela arginase-1. A vasoconstrição resultante desencadeia processos de isquemia e reperfusão, ocasionando uma série de eventos fisiopatológicos nos pacientes tais como,

crises de dor (crise álgica), síndrome torácica aguda, priapismo, acidente vascular cerebral entre outras manifestações (Figura 4) (3, 12, 19).

Devido aos recorrentes episódios de oclusão dos vasos e hemólise, os pacientes sofrem manifestações clínicas agudas e lesões crônicas nos órgãos, como, por exemplo, alterações nos rins, ocasionando a NF (1-5, 12).

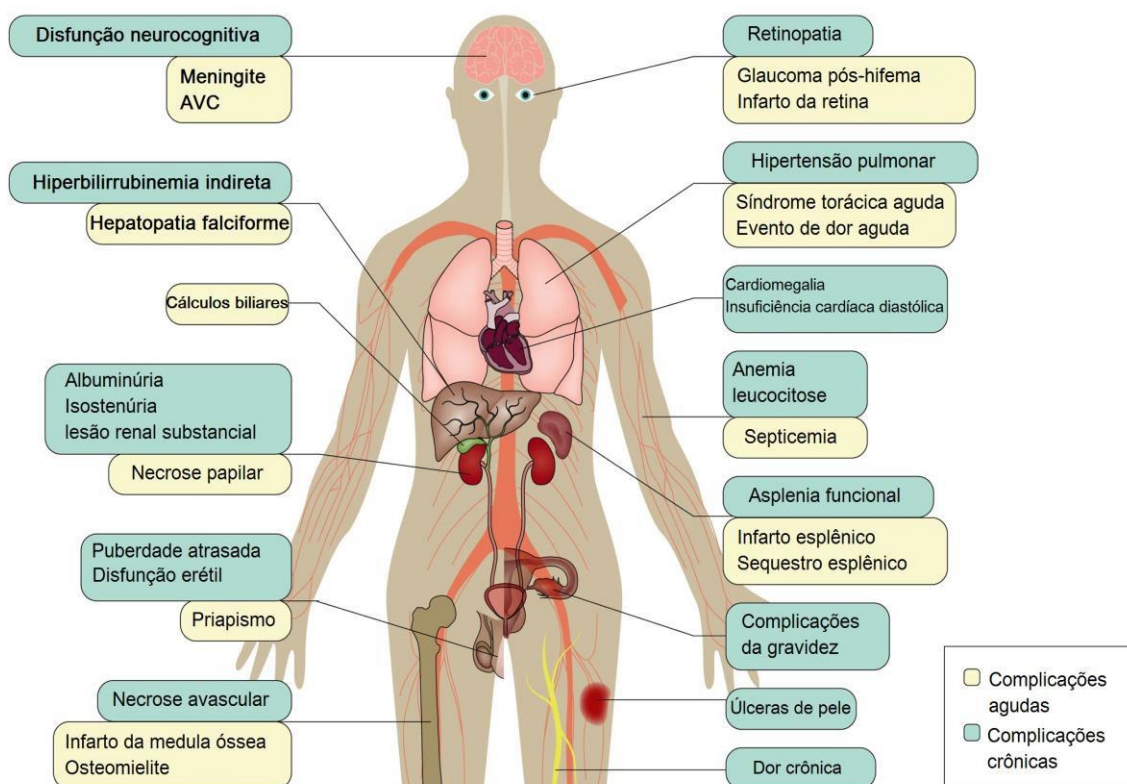


Figura 4: Manifestações clínicas da Anemia Falciforme. A anemia falciforme é caracterizada por diversas manifestações clínicas cujas complicações afetam o funcionamento de inúmeros órgãos, podendo causar agudamente meningite, acidente vascular cerebral, hepatopatia falciforme, cálculos biliares, necrose papilar, priapismo, infarto da medula óssea, osteomielite, entre outras. Como complicações crônicas observam-se disfunção neurocognitiva, hiperbilirrubinemia indireta, albuminúria, isostenúria, lesão renal, puberdade atrasada, disfunção erétil, necrose avascular, entre outras. Adaptado de Kato *et al.*, Nature, 2018.

2.2 Nefropatia Falciforme

A NF é uma complicação crônica, considerada uma das mais graves dentro da DF com importante taxa de mortalidade, podendo iniciar-se na infância. Os pacientes com DF que evoluem para DRCT tem mortalidade maior quando comparado a indivíduos em terapia de substituição renal sem DF (10, 20, 21, 22, 23, 24, 25).

Apesar dos tratamentos para melhora do curso clínico da doença, o caráter progressivo das lesões relacionado à idade, contribui consideravelmente para mortalidade e a expectativa de vida de pacientes com AF diminui drasticamente em virtude das lesões renais. A mortalidade geral fica em torno de 16-18% e tem como fatores importantes a redução da taxa de filtração glomerular (TFG) e a proteinúria. Alguns estudos sugerem que o fenótipo mais hemolítico da DF pode estar associado ao surgimento mais precoce de hiperfiltração e microalbuminúria (MA). (10, 24, 25).

O aumento da TFG é uma das primeiras manifestações clínicas da NF, podendo ser detectado desde os 12 meses de idade. A hiperfiltração glomerular leva à microalbuminúria (MA) e, subsequentemente, à proteinúria. A albuminúria começa a se desenvolver no decorrer da infância e pode afetar de 30% a 60% dos pacientes com AF (6, 10, 21, 22, 25). A NF é uma doença progressiva e doença renal crônica (DRC) em estágios iniciais afeta de 16% a 27% de pacientes pediátricos e em estágios mais avançados acomete de 5% a 18% de pacientes adultos com AF (10, 24, 25).

A fisiopatologia da NF ainda não é muito bem elucidada com múltiplos efeitos que lesam aos rins. Os fenômenos de vaso-oclusão e hemólise acarretam complicações, tais como hipertrofia glomerular e hiperfiltração glomerular com aumento precoce da TFG (23, 24, 25). Processos inflamatórios presentes na DF produzem intensa vasculopatia funcional, resultando em hipoperfusão renal, cortical e medular, que contribuem para a NF (Figura 5) (6, 10, 21, 25).

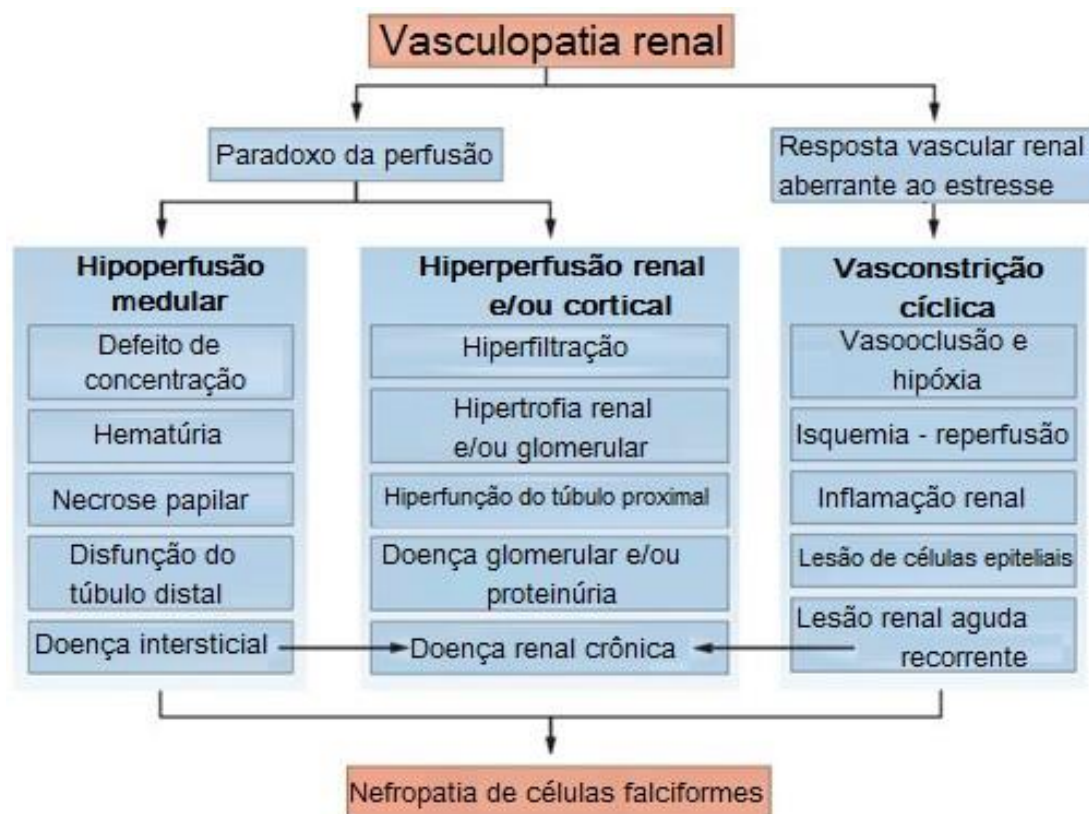


Figura 5: Sequência de eventos relacionados à nefropatia falciforme (NF). A NF ocorre em decorrência de múltiplos mecanismos que lesam os rins, ressaltando-se a vasculopatia funcional. A vasculopatia renal se caracteriza pela redução da perfusão da medular renal em paralelo ao aumento da perfusão do córtex renal. Em consequência à hipoperfusão da medula renal há defeito na capacidade de concentração urinária, hematúria, necrose papilar, disfunção tubular distal e lesão intersticial. A perfusão aumentada do córtex renal acarreta hiperfiltração e hipertrofia glomerular, aumento de reabsorção tubular proximal, proteinúria e doença renal crônica. Ocorre também uma resposta vascular renal ao estresse que se caracteriza por inflamação, fenômenos de isquemia e reperfusão, vaso-oclusão, hipóxia tecidual, lesão de células epiteliais e injúria renal aguda recorrente. Adaptado de Nath *et al.*, Nat Rev Nephrol, 2015.

O aumento da TFG e do fluxo sanguíneo renal é uma resposta compensatória à isquemia glomerular. Esse processo é, em parte, mediado pela liberação de prostaglandinas vasodilatadoras, principalmente na região cortical dos rins. Na região da medular dos rins, por outro lado, há isquemia. O extravasamento de sangue na medula renal ocorre em consequência da formação de hemácias falciformes nos vasos retos da medula, ocasionando também infarto microtrombótico. Isquemia e infarto na microcirculação renal são intensificados em virtude da viscosidade do sangue, acarretando em vasooclusões mais potentes que determinam necrose papilar e infartos renais (Figura 6) (21, 22, 23, 24, 25).

A medula interna dos rins de pacientes com AF é um ambiente ideal para polimerização da Hb S e hemólise intravascular secundária. Isso ocorre por ser um ambiente ácido, com alta osmolaridade, que possui baixo fluxo sanguíneo e reduzida pressão parcial de oxigênio (10–35 mmHg). A alta osmolaridade elimina água das hemácias, ajudando e aumentando a polimerização da Hb S. Todo esse microambiente associado à depleção do NO e ao aumento das concentrações de endotelina-1 promove vasoconstrição e estresse oxidativo, acarretando um círculo vicioso de hipóxia medular crônica. (8, 21, 24-25).

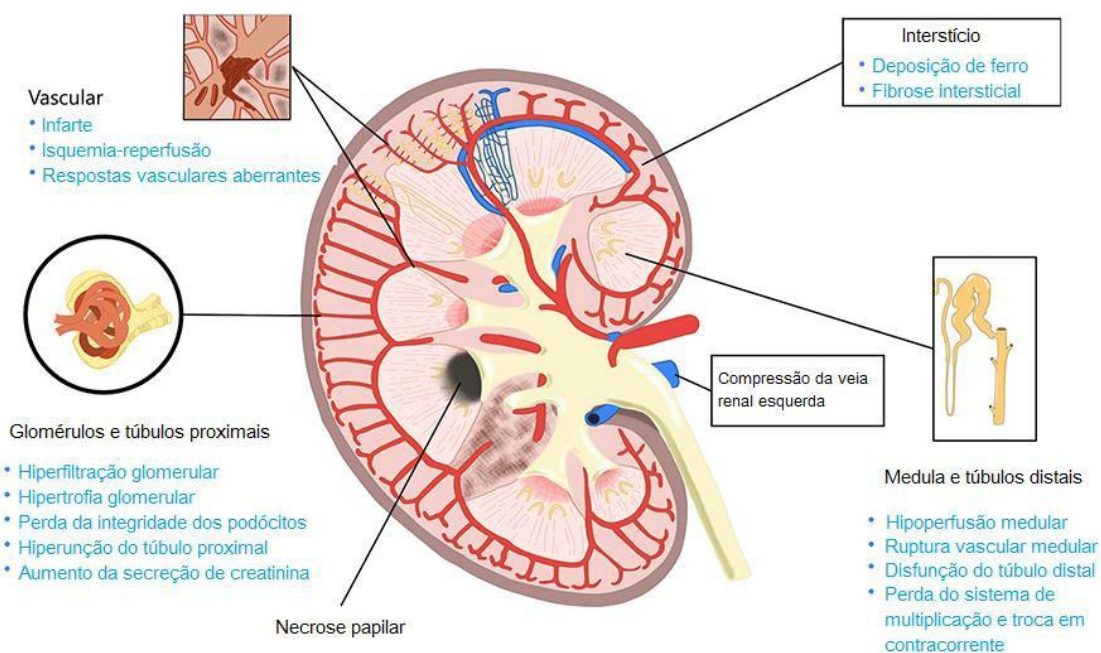


Figura 6: Fisiopatologia da nefropatia falciforme (NF). Alguns processos influenciam no início e na progressão da NF, incluindo exposição crônica do tecido renal a produtos de hemólise, ciclos repetidos de isquemia-reperfusão, hiperfiltração glomerular e hipoperfusão da medular renal, em consequência da vasculopatia da anemia falciforme. Adaptado de Olaniran *et al.*, Blood Purif, 2019.

O diagnóstico precoce da NF se dá pela detecção de hiperfiltração glomerular que resulta posteriormente em microalbuminúria e proteinúria. A avaliação das relações proteína/ creatinina e albumina / creatinina em amostra única de urina são exames de triagem úteis e de simples execução para detecção precoce da NF (21, 23, 25).

Alterações laboratoriais e histopatológicas renais como albuminúria, lesão dos túbulos renais, glomerulosclerose focal e segmentar, glomerulonefrite

membranoproliferativa, que ocorrem em consequência da hipertrofia e isquemia glomerular contínuas, são observadas em pacientes com DF (10, 21, 22). Outras possíveis alterações são disfunção do endotélio vascular, necrose papilar renal, baixa concentração urinária, lesão renal aguda e defeito na acidificação urinária. Essas diversas lesões podem contribuir para redução progressiva da TFG, doença renal DRC e DRCT (Figura 7) (6, 10, 24, 25).

Hematuria é muito comum na AF e microinfartos podem estar relacionados a leves sangramentos. Descamação da papila isquêmica e necrose papilar renal completa podem ocasionar graves obstruções e hemorragia que podem ser pioradas por infecções. Em alguns casos mais graves, o paciente pode necessitar de transfusões sanguíneas. Em consequência da formação local de hemácias falciformes, as papilas renais tornam-se mais susceptíveis às lesões isquêmicas, pois dependem diretamente dos vasos retos para seu suprimento sanguíneo (21, 23-25).

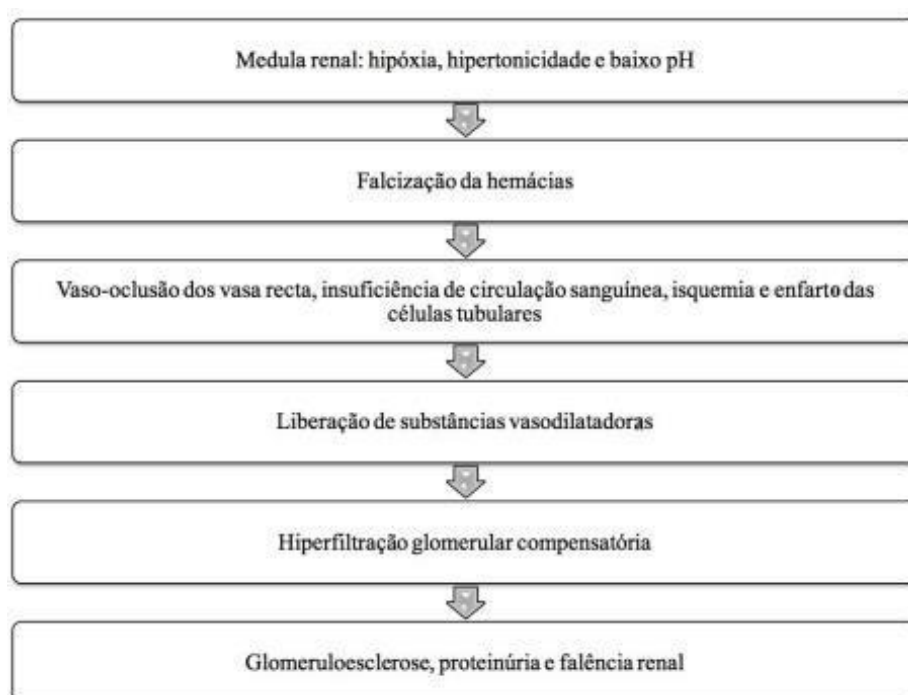


Figura 7: Processos fisiopatológicos da nefropatia falciforme. A medula renal de pacientes falciformes é um ambiente que favorece muito a falcização das hemácias, em consequência do baixo pH, hipóxia e hipertonicidade. Como resultado, há vaso-oclusão dos vasa recta, isquemia e infarto das células tubulares, desencadeando potente resposta inflamatória. Ocorrem, então, liberação de substâncias vasodilatadoras e hiperfiltração glomerular compensatória, que resulta em glomerulosclerose, proteinúria progressiva e falência renal. Adaptado de Lima *et al.*, Revista HUPE, Rio de Janeiro, 2015.

O manejo da NF ainda não está bem estabelecido, mas há estudos que defendem que pesquisas relacionadas ao uso de inibidores da enzima conversora de angiotensina para as alterações renais seriam de grande valia para um possível tratamento (26, 27, 28, 29, 30). A terapia de substituição renal é utilizada para os casos que evoluem para doença renal em estágio terminal. O uso da hidroxiureia (HU) aumenta os níveis de Hb F que inibe a polimerização da Hb S, podendo reduzir a necessidade de transfusão. Alguns estudos mostraram que o uso de losartan oral, antagonista de receptores angiotensinérgicos do tipo 1, pode reduzir a albuminúria (31, 32). Ressalta-se, porém, que a maior parte dos estudos são realizados com pacientes adultos.

2.3 Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é um processo decorrente do desequilíbrio entre os mecanismos antioxidantes e a produção de espécies EROs. As EROs são divididas em dois grupos distintos: com radical e sem radical. Os principais produtos ligados ao estresse oxidativo pertencentes a esses grupos são hidroxila (-OH), superóxido ($-O_2$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (18, 19, 33). As EROs que fazem parte do metabolismo normal do corpo humano são constantemente produzidas durante as reações do metabolismo aeróbico e como produto do metabolismo de oxigênio.

A produção de EROs é um processo fisiológico, controlado pelos sistemas antioxidantes, de forma altamente competente, e que não gera lesão à parede de hemácias saudáveis. O equilíbrio entre a formação de EROs e os mecanismos de defesa antioxidante determina o nível de estresse oxidativo, que, por sua vez, pode provocar alterações no DNA e lesões celulares (18,19, 34).

Muitas doenças crônicas estão relacionadas direta ou indiretamente com a produção de EROs (35, 36). Ressalta-se ainda que o aumento de EROs estimula a resposta inflamatória (18, 19, 34).

2.3.1 Estresse oxidativo na anemia falciforme

Pacientes com AF apresentam-se em estado inflamatório crônico, mesmo em fases clinicamente assintomáticas. A ativação de mediadores inflamatórios, lesão endotelial e aumento da expressão de moléculas de adesão podem ocorrer em decorrência da ação da EROs (8, 9, 37-39). Além de parâmetros inflamatórios, marcadores de estresse oxidativo

apresentam níveis elevados em pacientes com a AF quando comparados com pessoas saudáveis (40). O aumento de neutrófilos ativados mediado por NADPH é provavelmente um dos mecanismos que mostra a interação entre ERO e inflamação na AF (8, 9, 37, 39).

Múltiplos fatores ocasionados pelas lesões por isquemia e reperfusão e processos recorrentes de vaso-oclusão e hemólise favorecem consideravelmente o aumento de EROs na vasculatura de pacientes com AF. A diminuição dos mecanismos de defesa está diretamente relacionada com o aumento da gravidade da AF, ou seja, quanto mais hemácias adquirem a forma de foice, maior é a produção de EROs e há redução de enzimas capazes de manter o equilíbrio entre defesa antioxidante e estresse oxidativo. Em pacientes com AF, as células tendem a produzir duas vezes mais EROs e produtos de oxidação lipídica do que hemácias normais (3, 12-15, 37, 41).

A redução da defesa antioxidante em conjunto com as EROs presentes na vasculatura e as baixas concentrações de oxigênio contribuem para que as células endoteliais sejam ativadas, produzindo assim, aumento ainda maior da produção de EROs. Nesse processo ocorre ativação da enzima xantina oxidase liberada pelo fígado na corrente sanguínea e inativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), responsável pela síntese do NO. Como consequência, há consumo intravascular de NO pela hemoglobina livre liberada pós-hemólise, reduzindo ainda mais a biodisponibilidade de NO (1, 2, 3, 4, 5, 12, 13, 37, 39).

Os fenômenos mencionados podem ocasionar a formação de ânions superóxidos, auto-oxidação da hemoglobina S, aumento da atividade da NADPH e produção de dimetilarginina assimétrica, um inibidor endógeno de NO, que contribui consideravelmente para o aumento da EROs (1-3, 12, 37, 39). Um fator essencial para a ocorrência desses processos é a instabilidade das hemácias diretamente relacionada aos altos níveis de Hb S, resultando em ciclos recorrentes de polimerização e despolimerização. Esses ciclos em conjunto com exposição de proteínas da superfície celular induz a instabilidade da membrana, aumentando a probabilidade de hemólise (3, 21, 37, 39).

Enzimas protetoras contra o estresse oxidativo como superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPX) são de grande importância para manutenção do equilíbrio e metabolização das EROs. Estudos sugerem que polimorfismos nos genes dessas enzimas protetoras podem ter relação com o desequilíbrio entre mecanismos antioxidantes e a formação de EROs. Essas enzimas são

caracterizadas como defesa endógena que neutraliza EROs, impedindo a produção e ataque de radicais livres e atuando como antioxidantes preventivos (38, 42-46).

A SOD reduz o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. A enzima atua também como protetor do citocromo c, diminuindo assim os radicais livres. A GXP remove o peróxido de hidrogênio. Indiretamente, possui papel importante na eliminação e biotransformação de xenobióticos como defesa direta contra o estresse oxidativo (38, 44,45).

O estudo dessas enzimas, seus polimorfismos e dos marcadores de estresse oxidativo poderão auxiliar no entendimento do papel do estresse oxidativo na AF e sua relação com a ocorrência e gravidade da NF (38, 42, 43, 44, 45, 46).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência de marcadores de estresse oxidativo na ocorrência de albuminúria em pacientes pediátricos com AF.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar a genotipagem e determinar a frequência do polimorfismo rs4880 localizado no gene da proteína SOD2 na população estudada.
- Quantificar a atividade enzimática da GPX em amostras de urina de pacientes pediátricos com AF.
- Verificar a associação do polimorfismo rs4880 e da atividade enzimática da GPX com ocorrência de albuminúria na população estudada.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento e local do estudo

Trata-se de estudo transversal, parte de um estudo de coorte maior. O desfecho primário de interesse foi a albuminúria. A população de estudo consistiu em pacientes pediátricos com AF, triados por programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) em acompanhamento no Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. A análise da atividade enzimática e a genotipagem do polimorfismo foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Investigação Médica (LIIM).

4.2 Casuística

Um estudo maior foi realizado em pacientes pediátricos nascidos entre 1999 e 2015, triados pelo PTN-MG e em acompanhamento clínico regular no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. A referida coorte visa incluir todos os pacientes nascidos de 1999 a 2015 em acompanhamento no ambulatório da Fundação Hemominas, que é atualmente é composta por 701 pacientes pediátricos que participam desse estudo maior. O fluxograma abaixo (Figura 8), mostra que dos 701 pacientes com perfil SS / S β^0 -talassemia, 344 foram selecionados para participar do nosso estudo, incluídos a partir das possibilidades dos ensaios realizados e recursos disponibilizados. O critério principal da seleção foram pacientes que apresentavam albuminúria e controles que não apresentavam e que principalmente se encaixam nos critérios de inclusão. Foi realizada genotipagem em amostra de DNA de todos os pacientes selecionados e a análise da atividade enzimática foi feita em 120 pacientes.

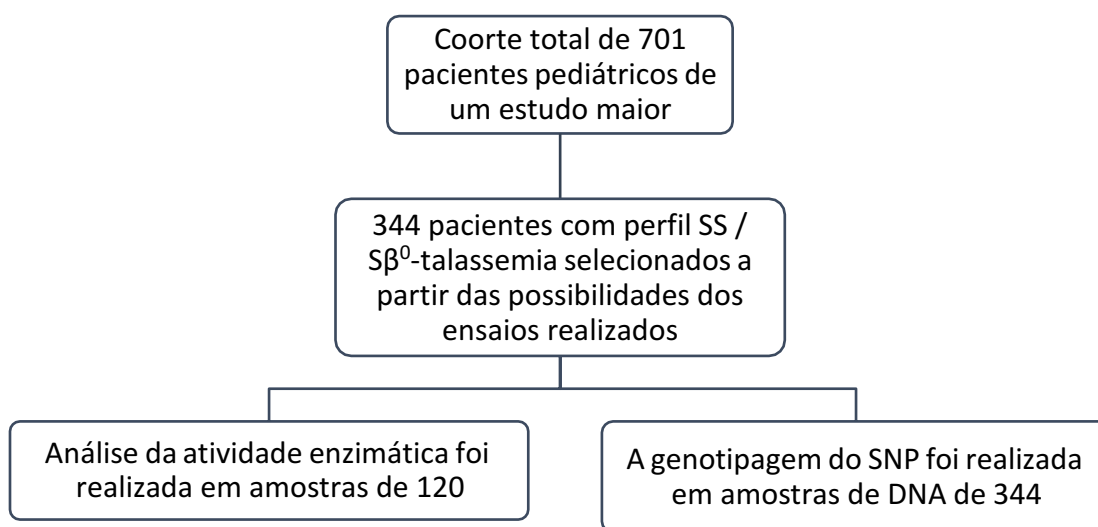


Figura 8: Fluxograma de seleção dos pacientes, com divisão dos experimentos realizados

4.3 Critérios de inclusão

Os seguintes critérios foram adotados para inclusão dos participantes neste estudo:

- Pacientes pediátricos com perfil hemoglobínico FS (genótipos SS ou S β^0 -talassemia) ao nascimento, nascidos entre 1999 e 2015 e acompanhados em serviço especializado.
- Confirmação, usando teste molecular, do genótipo homozigoto Hb SS.
- Consentimento para participação por meio de assinatura do termo de consentimento (ANEXO 1) e, quando aplicável, termo de assentimento.

4.4 Critérios de exclusão

Os seguintes critérios de exclusão foram adotados neste estudo:

- Pacientes com perfil hemoglobínico compatível com outros subtipos de DF (SC, SD-Punjab e S β^+ -talassemia).
- Pacientes ou familiares que não aceitaram participar do estudo.
- Pacientes que vierem a óbito.
- Pacientes com idade superior a 20 anos.

4.5 Variável resposta

Amostras únicas de urina, com técnica de limpeza adequada, foram coletadas durante o acompanhamento clínico de rotina dos participantes da coorte. O material foi analisado no LIIM, por meio da realização de exame de urina rotina e dosagem de albumina e creatinina em amostras de urina. Os exames utilizaram o kit comercial Creatinina - Gold Analisa, seguindo recomendações do fabricante.

Resumidamente, para a dosagem de creatinina, as amostras de urina foram previamente centrifugadas e pipetadas na placa, sendo utilizados 7 μ L de padrão e 1000 μ L de reagente de trabalho como controle ou 7 μ L de amostra e 1000 μ L de reagente de trabalho. Foram realizadas duas leituras no espectrofotômetro do padrão e teste em

540nm, com contagem de tempo diferente entre elas. A primeira leitura foi efetuada imediatamente antes dos 10 segundos e a segunda leitura aos 2 minutos.

Após o cálculo da razão albumina/creatinina urinária, considerou-se microalbuminúria resultado entre 30 e 300 mg/g de creatinina e macroalbuminúria resultado maior que 300 mg/g de creatinina. Para o propósito deste estudo, albuminúria foi definida como a presença de microalbuminúria ou macroalbuminúria. A albuminúria pode ser intermitente em indivíduos com AF (22). Uma vez que a razão albumina/creatinina na urina > 100 mg/g foi recentemente associado à albuminúria persistente (23), usamos essa definição como desfecho secundário.

4.6 Variáveis explicativas

4.6.1 Variáveis Genéticas

Amostras de sangue foram centrifugadas para separação da camada leucocitária durante 10 minutos a $2.000 \times g$. A extração de DNA foi realizada utilizando a camada leucocitária, usando o KIT Comercial QIAamp, DNA Blood Mini Kit, Qiagen, seguindo recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada por espectrofotômetro Nano Vueplus. O DNA foi diluído para a concentração de $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$, sendo utilizado na reação de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A análise do polimorfismo rs4880 (*SOD2*) foi realizada por PCR em tempo real. Na placa de PCR, foram pipetados $2 \mu\text{L}$ de DNA e $18 \mu\text{L}$ de mix, composto por água, TaqMan Genotyping Master Mix e a sonda rs4880 Applied Biosystems. A amplificação do DNA consistiu em 55 ciclos repetidos, sendo três etapas de desnaturação (4 min a 94°C), anelamento (30 s a 60°C) e extensão (45 s 72°C), seguidas de alongamento final de 5 minutos a 72°C . A técnica de genotipagem foi baseada em fluorescência, usando TaqMan. As reações foram realizadas na plataforma QuantStudio® 3 Real-Time PCR (Applied Biosystems®).

4.6.2 Dosagem da atividade enzimática da *Glutathione Peroxidase*

A atividade enzimática da GPX foi medida por teste colorimétrico, em amostras de urina, utilizando kit comercial Glutathione Peroxidase Assay Kit - Cayman Chemical, seguindo recomendações do fabricante. Na placa de ELISA foram utilizados 50 µl de tampão de ensaio, 50 µl de mistura de co-substrato, 50 µl de NADPH e 20 µl de GPX diluído para controle positivo. Para *background*, foram pipetados 70 µl de tampão de ensaio, 50 µl de mistura de co-substrato e 50 µl de NADPH. No restante da placa, foram adicionados 50 µl de tampão de ensaio, 50 µl de mistura de co-substrato, 50 µl de NADPH e 20 µl de amostra.

A atividade foi calculada com base no coeficiente de extinção molar do NADPH, de 0,00373 µM⁻¹ que determina a taxa de reação a 340 nm. Uma unidade foi definida como a quantidade de enzima que causará a oxidação de 1,0 nmol de NADPH.

4.7 Análise estatística

Dois variáveis resposta foram avaliadas neste estudo: 1) albuminúria, como variável dicotômica (presente e ausente); 2) albuminúria persistente, como variável dicotômica (presente e ausente). As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil, conforme apropriado. Variáveis categóricas foram expressas como porcentagens do total. A distribuição normal das variáveis contínuas foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre as variáveis contínuas foi realizada pelo teste t de Student não pareado ou teste U de Mann-Whitney, conforme a distribuição. As associações entre as variáveis categóricas foram avaliadas usando qui-quadrado bicaudal ou teste exato de Fisher. Os testes de correlação de Pearson ou Spearman avaliaram as correlações entre duas variáveis contínuas. Foi também realizada regressão logística para avaliar os fatores independentemente associados aos desfechos. As covariáveis foram ajustadas ao modelo de regressão logística de acordo com as variáveis idade e tratamento em uso. A regressão logística multivariada foi realizada usando o método de eliminação manual *backward*. As variáveis que contribuíram significativamente para o modelo final, ou seja, com p-valor < 0,05, foram mantidas no modelo final. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 21.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL, EUA).

4.8 Considerações éticas

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Éticas da Fundação Hemominas (CAAE – 018. 12712. 7. 3001. 5118) e o COEP da UFMG. Os pacientes foram convidados a participar do estudo pela equipe de pesquisa. Aqueles que aceitaram participar, foram incluídos no estudo mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). O termo foi assinado pelos pais ou responsáveis e pelo paciente com 7 anos ou mais de idade (termo de assentimento).

Todas as informações do estudo foram mantidas em sigilo para preservar a identidade dos pacientes e todo material biológico coletado foi utilizado somente para pesquisa.

5. RESULTADOS

5.1 População do estudo

Das 701 crianças incluídas na coorte, 344 (62,5%) foram incluídas neste estudo. As características demográficas dos participantes do estudo são mostradas na tabela 1. Dos 344 participantes, 87 (25,3%) apresentavam albuminúria e 32 (9,3%) apresentavam albuminúria persistente. A maioria das crianças era do sexo feminino e possuía entre 7 a 12 anos. A albuminúria foi significativamente associada ao aumento da idade ($p < 0,001$). Duzentas e três (59%) crianças estavam recebendo HU, três (0,9%) estavam em regime de transfusão crônica e 31 (9,0%) estavam recebendo as duas terapias. Não houve associação entre albuminúria e as terapias em uso.

Tabela 1 – Características demográficas dos participantes do estudo de acordo com a ocorrência de albuminúria

Características	Normoalbuminúria	albuminúria	OR (IC 95%)	P valor
Sexo				
Feminino	119 (73,0%)	44 (27,0%)	1 (ref.)	0,53 ^a
Masculino	138 (76,2%)	43 (23,8%)	1,2 (0,7 - 1,9)	
Idade				
1 a 6 anos	82 (86,3%)	13 (13,7%)		<0,001 ^b
7 a 12 anos	97 (76,4%)	30 (23,6%)		
13 a 17 anos	73 (67,6%)	35 (32,4%)		
≥ 18 anos	5 (35,7%)	9 (64,3%)		
Terapia em uso				
Nenhum	79 (73,8%)	28 (26,2%)		0,75 ^b
HU	155 (76,4%)	48 (23,6%)		
HU + HTX	21 (67,7%)	10 (32,3%)		
HTX	2 (66,7%)	1 (33,3%)		

^a teste exato de Fisher; ^b teste do qui-quadrado

5.2 Análise da associação entre o polimorfismo SOD2 e a ocorrência de albuminúria

Dos 344 participantes do estudo, 88 (25,6%) apresentaram o genótipo TT, 187 (54,4%) o genótipo TC e 69 (20,1%) o genótipo CC. Não houve associação entre o polimorfismo rs4880 e a ocorrência de albuminúria (Tabela 2) e nem com albuminúria persistente (Tabela 3).

Tabela 2 - Frequência do polimorfismo rs4880 na população de acordo com a ocorrência de albuminúria

Genótipo	Normoalbuminúria	Albuminúria	OR (IC 95%)	P valor
TT	65 (73,9%)	23 (26,1%)		0,95 ^a
TC	141 (75,4%)	46 (24,6%)		
CC	51 (73,9%)	18 (26,1%)		
Modelo dominante				
TT	65 (73,9%)	23 (26,1%)	1 (ref.)	0,88 ^b
TC ou CC	192 (75%)	64 (25,0%)	0,9 (0,5 - 1,6)	
Modelo recessivo				
CC	51 (73,9)	18 (26,1%)	1 (ref.)	0,88 ^b
TT ou TC	206 (74,9%)	69 (25,1%)	1,1 (0,6 - 1,9)	

^a teste do qui-quadrado; ^b teste exato de Fisher.

Tabela 3 - Frequência do polimorfismo rs4880 na população de acordo com a ocorrência de albuminúria persistente

Genótipo	Normoalbuminúria	Albuminúria persistente	OR (IC 95%)	P valor
TT	81 (92%)	7 (8%)		0,73 ^a
TC	170 (90,%)	17 (9,1%)		
CC	61 (88,4%)	8 (11,6%)		
Modelo dominante				
TT	81 (92%)	7 (8%)	1,3 (0,5 - 3,0)	0,83 ^b
TC ou CC	231 (90,7)	25 (9,8%)		
Modelo recessivo				
CC	61 (88,4%)	8 (11,6%)	1,3 (0,6 - 3,2)	0,49 ^b
TT ou TC	251 (91,3%)	24 (8,7%)		

^a teste do qui-quadrado; ^b teste exato de Fisher.

5.3 Análise da associação entre a atividade enzima GXP e a ocorrência de albuminúria

A atividade da enzima GXP foi mensurada em amostras de 120 pacientes, sendo 60 (50%) do sexo feminino e 60 (50%) do sexo masculino. Dos 120 participantes, 80 (66,7%) apresentavam albuminúria e 32 (26,7%) apresentavam albuminúria persistente. Não houve associação entre o sexo e a atividade da enzima GXP (Gráfico 1). Não houve correlação entre idade e a atividade da enzima GXP (rho de Spearman = 0,120; p = 0,191). Além disso, não houve associação entre a terapia em uso e a atividade da enzima (p = 0,175). A atividade da enzima GXP foi menor nos participantes com albuminúria persistente, entretanto, a diferença não foi significativa (Tabela 4). Não houve correlação

entre a relação albumina/creatinina na urina e a atividade da enzima GXP (rho de Spearman = - 0,110; p = 0,230).

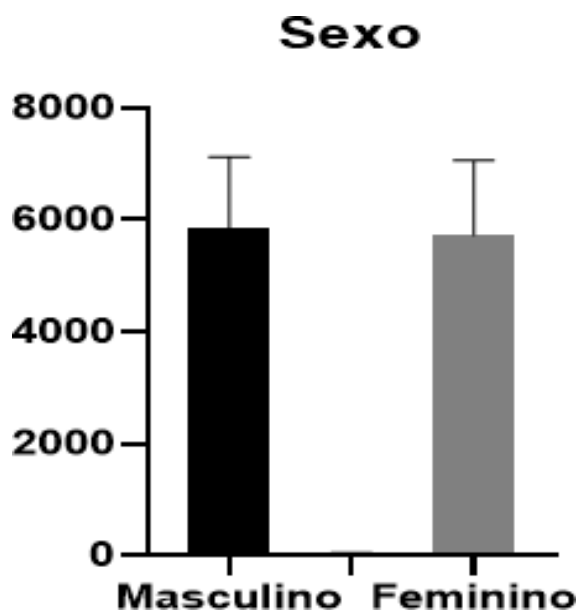


Gráfico 1: Atividade da enzima GPX em pacientes pediátricos anemia falciforme de acordo com o sexo. P = 0,201. Teste: Mann Whitney.

Tabela 4 - Comparação da atividade da enzima GXP em pacientes pediátricos com Anemia Falciforme de acordo com a presença ou não de albuminúria

Albuminúria			
	Presente	Ausente	Valor de P ^a
Mediana	5687,1	6012,4	0,333
Albuminúria persistente			
	Presente	Ausente	Valor de P ^a
Mediana	5712,6	5825,7	0,836

^a teste Mann Whitney.

5.4 Análise multivariada

Na análise ajustada pela idade, sexo e terapias em uso (modelo inicial Tabela 5), não houve associação entre o polimorfismo rs4880 ou a atividade da enzima GXP e a ocorrência de albuminúria ou albuminúria persistente. Os modelos multivariados finais mantiveram apenas a idade como variável preditora independente dos desfechos albuminúria e albuminúria persistente (Tabela 5).

Tabela 5 – Análise multivariada dos fatores associados a albuminúria e albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais

Variáveis	Albuminúria				Albuminúria persistente			
	Modelo inicial		Modelo Final		Modelo inicial		Modelo Final	
	OR (IC 95%)	Valor de p	OR (IC 95%)	Valor de p	OR (IC 95%)	Valor de p	OR (IC 95%)	Valor de p
Sexo								
Masculino	1,0 (Ref)				1,0 (Ref)			
Feminino	0,78 (0,3 - 2,1)	0,63			0,76 (0,3 - 2,0)	0,59		
Idade								
1 a 6	1,0 (Ref)		1,0 (Ref)		1,0 (Ref)		1,0 (Ref)	
7 a 12	0,6 (0,2 - 1,6)	0,31	2,0 (0,9 - 4,0)	0,06	1,8 (0,5 - 5,7)	0,35	1,0 (0,3 - 3,4)	0,94
13 a 17	3,5 (0,4 - 34,6)	0,33	3,0 (1,5 - 6,2)	0,02	4,6 (0,9 - 23,2)	0,06	2,9 (1,01 - 8,3)	0,04
≥ 18			11,3 (3,3 - 39,2)	< 0,001			10 (2,5 - 41,2)	0,001
Terapias em uso								
Nenhum	1,0 (Ref)				1,0 (Ref)			
HU	0,87 (0,3 - 2,5)	0,79			1,2 (0,4 - 4,1)	0,65		
HU + HTX	1,5 (0,3 - 7,6)	0,58			1,0 (0,2 - 5,6)	0,97		
HTX	1,0 (0,04 - 29,8)	0,99				0,99		
Atividade da enzima GXP								
	1,0 (0,9 - 1,0)	0,48			1,0 (1,0 - 1,0)	0,94		
SOD2 rs4880								
TT	1,0 (Ref)				1,0 (Ref)			
TC	1,8 (0,6 - 5,5)	0,32			1,6 (0,4 - 5,5)	0,46		
CC	0,8 (0,2 - 3,1)	0,78			1,7 (0,4 - 7,5)	0,2		

6. DISCUSSÃO

A AF possui impacto significativo na qualidade de vida dos pacientes, que apresentam crises dolorosas e necessitam de internações recorrentes. O Brasil possui altos níveis de miscigenação racial devido à migração de populações oriundas de outros países, incluindo da África. Portanto, a AF é uma doença frequente na população brasileira (2, 7, 13) e é considerada um problema de saúde pública no país (2, 47, 48).

A NF é uma causa comum de morbidade e mortalidade na DF. Os mecanismos da NF não são totalmente elucidados. Considera-se que a NF resulte de isquemia e necrose associada à falcização das hemácias (20, 49, 50). A fisiopatologia é caracterizada por hipostenúria na infância que progride para hiperfiltração glomerular, albuminúria, glomeruloesclerose focal e DRCT. O estresse oxidativo possui papel relevante no quadro clínico da AF, contribuindo para a gravidade da NF. Em um estudo experimental utilizando camundongos HbSS adultos humanizados, a endotelina -1 contribuiu para o estresse oxidativo e lesão glomerular (51). Diversos mecanismos presentes na AF desencadeiam atividade elevada da endotelina-1, tais como aumento da angiotensina II, hipóxia, biodisponibilidade reduzida de NO e inflamação. Ocorre um ciclo potencialmente vicioso de produção contínua de EROs, que determina aumento do estresse oxidativo (51). De forma semelhante, Swarnava et al, utilizando o modelo de camundongo falciforme de Berkeley, demonstrou que o aumento do estresse oxidativo na DF ativa o Sistema Renina-Angiotensina, que, por sua vez, estimula a produção de TGF- β que contribui para a ocorrência da NF (52). Nath et al, em uma abordagem experimental com camundongos transgênicos que apresentam AF, também relatou que quantidades aumentadas de peroxidação lipídica indicam estresse oxidativo nos rins (24). Além disso, a inibição da síntese de glutatona com butionina-sulfoximina aumentou drasticamente a falcização das hemácias no rim falciforme, levando a uma produção exacerbada de EROs e ao estresse oxidativo (24).

O principal objetivo do presente estudo foi avaliar a associação entre a albuminúria e marcadores de estresse oxidativo. Mais especificamente, foram avaliados potenciais associações entre a presença ou não da albuminúria com o polimorfismo rs4880 do gene que codifica a enzima SOD2 e a atividade da enzima GPX. Nossos dados mostram que, na nossa população de 344 pacientes, 25,3% (87 pacientes) apresentavam albuminúria e 9,3% (32 pacientes) apresentavam albuminúria persistente. Não houve associação entre

albuminúria e o polimorfismo rs4880. Também não houve associação entre albuminúria e a atividade da enzima GPX.

O polimorfismo rs4880 ou Val16Ala foi identificado na sequência de direcionamento do gene da enzima SOD2 (53). Um estudo *in vitro* mostrou que o aminoácido valina (Val) em substituição ao aminoácido alanina (Ala) resulta em transporte menos eficiente da enzima SOD2 para a matriz mitocondrial (43), o que pode comprometer a capacidade de neutralizar os radicais superóxidos na célula.

Considerando que estudos prévios relacionam o estresse oxidativo e a NF (54), avaliamos a influência do polimorfismo rs4880 na ocorrência de albuminúria. No entanto, não encontramos associação significativa com a presença de albuminúria e nem com albuminúria persistente. Nossos dados estão de acordo com os resultados de um estudo previamente publicado que avaliou o mesmo polimorfismo em pacientes adultos com NF (55). Os autores não encontraram diferenças significativas entre os genótipos do polimorfismo rs4880 em relação à presença de albuminúria. Foram avaliados 63 pacientes com AF e, destes, apenas 3 apresentavam macroalbuminúria e possuíam o genótipo CC, porém sem significância estatística (55). Esse genótipo pode estar ligado a gravidade de algumas doenças e, por isso, foi considerado candidato potencial a ser associado à presença de albuminúria.

O polimorfismo rs4880 foi avaliado em uma coorte brasileira de pacientes adultos com AF e acidente vascular cerebral (AVC). Os autores verificaram que a presença do alelo C do polimorfismo rs4880 aumentou significativamente o risco de AVC e a incidência acumulada dessa complicação em pacientes com AF (38). No entanto, os mecanismos responsáveis pelo efeito do polimorfismo rs4880 do gene da SOD2 em relação à capacidade antioxidante, levando ao desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas da AF, ainda não são totalmente compreendidos. Funcionalmente, esse polimorfismo pode levar a uma modificação na estrutura secundária da proteína codificada, resultando em níveis enzimáticos alterados ou diferenças na atividade da SOD (38). Tal efeito regulatório poderia explicar os resultados favoráveis para os indivíduos que possuem o genótipo TT em relação àqueles que possuem o genótipo CC, onde a presença do alelo C produziria redução dos níveis enzimáticos e aumentaria o risco para o desenvolvimento de AVC na AF (38).

Jówko et al. mostraram aumento da atividade sérica de SOD de maneira dependente de valina expressa pelo alelo T, e concluíram que o polimorfismo rs4880 do gene da SOD2 contribui para variabilidade no estado de estresse oxidativo (56). De forma similar,

Farias et al. mostraram que a atividade da enzima SOD2 foi maior em pacientes com genótipo TT e que o polimorfismo rs4880 poderia modular a frequência de crises vasculares e sequestro esplênico agudo em pacientes com DF (57). A alta frequência do polimorfismo rs4880 e as associações relatadas com complicações clínicas da DF corroboram a hipótese de que o estudo desse polimorfismo pode contribuir para o entendimento do vasto espectro fenotípico da doença (58).

Apesar de existirem estudos mostrando a associação do polimorfismo rs4880 e manifestações clínicas da DF, não foi possível a comparação direta com os nossos dados pela escassez de estudos que avaliaram desfechos renais. Com base nos nossos dados, é possível que o polimorfismo rs4880 não exerça papel significativo na ocorrência de albuminúria em pacientes pediátricos com DF. Por outro lado, esse mesmo polimorfismo se mostrou relevante para o desenvolvimento de nefropatia diabética (59), que apresenta fisiopatologia similar à NF. Novos estudos, usando desfechos mais definitivos como a doença renal crônica estágios 3 e 4 ou a DRCT, são necessários para verificar o efeito do polimorfismo rs4880 na ocorrência de NF.

A outra avaliação referente à potencial associação de estresse oxidativo com a NF realizada neste estudo foi a dosagem da atividade da enzima GPX. A atividade dessa enzima foi avaliada em amostras de 120 pacientes, sendo 80 pacientes que apresentavam albuminúria e, destes 32 pacientes tinham albuminúria persistente. Não houve associação entre sexo, idade, presença ou não de albuminúria ou de albuminúria persistente com a atividade da enzima GPX. A GPX está presente em altas concentrações nas hemácias e atua como uma importante fonte redutora de estresse oxidativo para manter a integridade celular (60).

A GPX atua na desintoxicação de peróxidos orgânicos e inorgânicos e utiliza a glutathione reduzida, que age como um potente antioxidante endógeno, capaz de neutralizar radicais livres, ajudando a proteger as células da lesão oxidativa. A enzima atua em muitos processos biológicos, seja direta ou indiretamente, e é considerada um marcador de estresse oxidativo (60, 61, 62).

Apesar da enzima GPX possuir um grande potencial de proteção para as células, os níveis reduzidos comumente encontrados em indivíduos com AF acarretam o aumento do estresse oxidativo. O potencial antioxidante reduzido pode estar associado à peroxidação acelerada da membrana das hemácias (62). Portanto, a anemia hemolítica que é observada

em pacientes com AF, pode ocorrer, em parte, por causa da diminuição da atividade da GPX (60, 63, 64).

Emokpae et al avaliaram a correlação do estresse oxidativo e marcadores inflamatórios com a gravidade da NF em uma coorte de pacientes adultos do Hospital Universitário Aminu Kano, Nigéria (9). Este estudo mostrou o aumento da geração de EROs decorrente da diminuição da atividade sérica de enzimas antioxidantes em pacientes com DF associada à doença renal crônica. Houve também aumento dos marcadores de inflamação, que se associaram significativamente com a gravidade da doença renal (9). Outro estudo do mesmo autor mostrou que determinação da atividade enzimática de GPX, SOD e catalase foram significativamente menores em indivíduos com DF que apresentavam macroalbuminúria e DRC, enquanto o nível de malonildialdeído foi maior em indivíduos com DF com macroalbuminúria e DRC em comparação com os controles, corroborando com dados do estudo anterior (46).

Gizi et al avaliaram o sistema glutationa e o estado oxidante-antioxidante em pacientes com DF (64). Os resultados mostraram que as EROs estavam significativamente aumentadas, enquanto que a defesa antioxidante estava significativamente reduzida no grupo com AF em comparação com controles saudáveis. A medida da atividade de GPX foi 32 a 36% menor no grupo de pacientes com AF. Idade e genótipo, bem como o uso de HU e hemotransfusões, parecem não desempenhar nenhum papel no estado oxidativo dos pacientes (64). Os resultados encontrados podem ser explicados pelo aumento do estresse oxidativo, que, em pacientes com AF, é cerca de duas vezes maior, devido à instabilidade da HbS, precipitação, grandes concentrações de ferro, altas taxa de hemólise, desnaturação da molécula proteica de hemoglobina e desoxigenação (8, 37, 41, 65, 66, 67).

No presente estudo, a atividade da enzima GPX foi menor nos participantes com albuminúria e albuminúria persistente. Entretanto, as diferenças não foram significativas. Não houve associação dos marcadores de estresse oxidativo analisados e a ocorrência de albuminúria. Apesar de ser bem descrito o papel do estresse oxidativo na fisiopatologia da AF, encontramos, porém, pouquíssimos estudos que analisaram a influência do estresse oxidativo nos desfechos renais em pacientes pediátricos. Na literatura, encontramos somente um artigo onde a dosagem da enzima GPX foi realizada em pacientes pediátricos. Trata-se do estudo de *Itokua et al* que mostrou que a albuminúria foi inversamente correlacionada com os níveis das enzimas antioxidantes GPX e SOD

(68). No referido estudo, foram obtidas amostra de sangue venoso para determinar níveis de GPx e SOD, bem como outros parâmetros bioquímicos de interesse, incluindo HbF, hemograma, creatinina sérica, bilirrubina total e suas frações, lactato desidrogenase, ferro, ferritina, proteína C reativa e Hb livre. Os níveis de GPX e SOD foram mensurados no plasma por ensaio imunoenzimático. Albuminúria normal, microalbuminúria e macroalbuminúria foram definidas como razão albumina creatinina urinária < 30 mg/g, de 30 a 299 mg/g e ≥ 300 mg/g, respectivamente (68). A coorte do estudo incluiu 70 crianças com AF. A razão albumina creatinina urinária foi avaliada em 68 crianças. Macroalbuminúria não foi encontrada e microalbuminúria foi detectada em 11,8% dos casos, sendo mais comum nas meninas do que nos meninos, porém sem diferença estatística. Dos 70 pacientes, 37 receberam HU e, em comparação com os pacientes que não usaram a medicação, os casos em uso de HU apresentaram maiores concentrações de GPX e SOD. Os pacientes tratados com HU também apresentaram níveis mais baixos de razão albumina creatinina urinária, porém sem diferença estatisticamente significativa em relação aos casos que não receberam a medicação (68). Os autores consideraram que a albuminúria pode estar associada ao aumento dos níveis de marcadores de hemólise e inflamação e diminuição da capacidade antioxidante (68).

Outros fatores que avaliamos no presente estudo foram a associação de albuminúria e albuminúria persistente com sexo, idade e tratamento utilizado. A albuminúria foi significativamente associada ao aumento da idade ($p < 0,001$), confirmando achados de estudos anteriores. Dados prévios de nossa coorte de pacientes com AF mostraram que o risco cumulativo de albuminúria foi de 88,7% aos 20 anos de idade (69). A albuminúria foi fortemente associada ao aumento de idade. Além disso, não houve associação entre a prevalência de albuminúria e o sexo ou terapia com HU e regime de transfusão crônica (69). Shatat et al. avaliaram, em uma coorte de 353 crianças com DF e microalbuminúria, se havia ou não alterações na proporção de microalbumina-creatinina na urina ao longo do tempo (70). O estudo mostrou que idade mais avançada, baixos níveis de HbF e bilirrubina mais alta estavam associados à albuminúria ao longo do tempo. Ao examinar os preditores de progressão da relação microalbumina-creatinina na urina, os autores encontraram uma interação significativa entre idade e histórico de transfusão de sangue, o que exigiu estratificar os modelos estatísticos por histórico de transfusão. Crianças com história de uma ou mais transfusões de sangue durante o período do estudo (provavelmente crianças com formas mais graves da doença, com crises possivelmente

mais frequentes, aumento da velocidade do Doppler transcraniano, anemia mais grave e hemólise com necessidade de transfusão de sangue) tinham maior probabilidade de apresentar aumento da relação microalbumina-creatinina quando mais velhos e/ou em caso de níveis mais elevados de bilirrubina (70).

Em nosso estudo, não houve associação de albuminúria ou albuminúria persistente com sexo e nem com os tratamentos em uso, corroborando os achados de um estudo previamente publicado (71). McKie et al, a fim de avaliar a segurança e eficácia da HU e do uso de inibidor da enzima conversora de angiotensina, analisaram a associação da microalbuminúria com idade, sexo, tratamento e níveis de hemoglobina (71). O aumento da idade e os baixos níveis de hemoglobina foram relacionados à microalbuminúria, mas não houve associação com sexo. Em relação ao tratamento, a excreção de albumina normalizou em 44% dos pacientes tratados com HU e 56% dos pacientes tratados com inibidor da enzima conversora de angiotensina (71).

Alguns tratamentos podem ser benéficos na AF. Estudos previamente publicados mostraram que o uso da HU aumenta a expressão da GPX em múltiplas linhagens celulares (64, 72-75). Cho *et al* mostraram que atividade da GPX se apresentava reduzida em cerca de 33% em eritrócitos falciformes comparados com controles saudáveis, relacionando essa perda de atividade com hemólise em pacientes com AF (73). Pacientes tratados com HU apresentaram 90% mais atividade da GPX do que pacientes não tratados, confirmando que o aumento da expressão de GPX representa um benefício potencial anteriormente não reconhecido do tratamento com HU em pacientes com DF (73). No entanto, nosso estudo não mostrou diferença significativa na atividade da enzima em relação ao uso de HU.

O presente estudo possui várias limitações. Primeiro, o estudo incluiu um número amostral relativamente pequeno, principalmente na análise da atividade de GPX, o que resultou em um poder estatístico limitado. Devido a essa preocupação, no modelo multivariado, incluímos vários possíveis fatores de confusão e, portanto, os resultados também podem ser enviesados por confusão residual. Segundo, estudamos um desfecho intermediário, a presença de albuminúria. Talvez desfechos mais definitivos como a DRC estágio 3 e 4 ou DRCT poderiam mostrar resultados diferentes. Adicionalmente, a ausência de análises longitudinais pode ter afetado a capacidade de detectar possíveis associações entre marcadores de estresse oxidativo e a ocorrência de NF. Por exemplo, crianças sem albuminúria podem desenvolver essa alteração no futuro, dada a natureza

progressiva da NF em indivíduos com AF. Como albuminúria é frequentemente intermitente em indivíduos com AF, uma única amostra de urina pode não refletir de forma confiável o verdadeiro risco de NF de uma criança. Ressalte-se que, na concepção deste estudo, planejamos realizar mais experimentações, que foram diretamente afetadas pela falta de recursos e o cenário de pandemia. Além de realizar a genotipagem do polimorfismo rs4880 e a dosagem de GPX em toda a coorte, também pretendíamos estudar pelo menos um polimorfismo do gene de GPX e realizar a dosagem enzimática da SOD2.

Para melhor entendimento da ação do estresse oxidativo na NF é necessário avaliar as enzimas SOD2 e Catalase, polimorfismos de GPX e Catalase, bem como quantificar os níveis urinários e plasmáticos das moléculas 8-hidroxi-guanosina (8-OHG), 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHDG) e 8-hidroxi-guanina (marcadores de estresse oxidativo). Dessa forma, estudos adicionais são necessários para avaliar o papel de marcadores de estresse oxidativo, polimorfismos genéticos e a capacidade antioxidante nos pacientes pediátricos com AF.

7. CONCLUSÕES

- Não houve associação entre o polimorfismo rs4880 e a ocorrência de albuminúria ou albuminúria persistente na amostra estudada.
- Não houve associação entre atividade da enzima GPX e a ocorrência de albuminúria ou albuminúria persistente na amostra estudada.

REFERÊNCIAS

1. GARDNER, R. V. Sickle cell disease: Advances in treatment. *Ochsner Journal*, v. 18, n. 4, p. 377–389, 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
2. CANÇADO, R. D.; JESUS, J. A. A doença falciforme no Brasil. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 29, n. 3, set. 2007. Acesso em: 24 fev. 2022.
3. KATO, G. J. *et al.* Sickle cell disease. *Nature Reviews Disease Primers*, v. 4, n. 1, 15 mar. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
4. SHRINER, D.; ROTIMI, C. N. Whole-Genome-Sequence-Based haplotypes reveal single origin of the sickle allele during the holocene wet phase. *The American Journal of Human Genetics*, v. 102, n. 4, p. 547–556, abr. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
5. SERJEANT, G. R. The natural history of sickle cell disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, v. 3, n. 10, p. a011783–a011783, 28 jun. 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
6. MOREIRA, J. A. *et al.* Pattern of hemolysis parameters and association with fetal hemoglobin in sickle cell anemia patients in steady state. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 37, n. 3, p. 167–171, maio 2015. Acesso em: 24 fev. 2022.
7. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada. Doença falciforme: condutas básicas para tratamento / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Especializada. – 1. ed., 1. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.
8. NUR, E. *et al.* Oxidative stress in sickle cell disease; pathophysiology and potential implications for disease management. *American Journal of Hematology*, v. 86, n. 6, p. 484–489, 4 maio 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.

9. EMOKPAE, M.; UADIA, P.; GADZAMA, A. Correlation of oxidative stress and inflammatory markers with the severity of sickle cell nephropathy. *Annals of African Medicine*, v. 9, n. 3, p. 141, 2010. Acesso em: 24 fev. 2022.
10. ALVAREZ, O. *et al.* Early blood transfusions protect against microalbuminuria in children with sickle cell disease. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 47, n. 1, p. 71–76, 2006. Acesso em: 24 fev. 2022.
11. OTIS, S.; PRICE, E. A. Hemoglobinopathies and Hemolytic Anemias. *DeckerMed Medicine*, 1 jan. 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
12. BRUGNARA, C. Erythrocyte dehydration in pathophysiology and treatment of sickle cell disease. *Current Opinion in Hematology*, v. 2, n. 2, p. 132–138, 1995. Acesso em: 24 fev. 2022.
13. LERVOLINO, L. G. *et al.* Prevalence of sickle cell disease and sickle cell trait in national neonatal screening studies. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 33, n. 1, p. 49–54, 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.
14. STEINBERG, M. H.; SEBASTIANI, P. Genetic modifiers of sickle cell disease. *American Journal of Hematology*, v. 87, n. 8, p. 795–803, 28 maio 2012. Acesso em: 24 fev. 2022.
15. PECKER, L. H.; LANZKRON, S. Sickle Cell Disease. *Annals of Internal Medicine*, v. 174, n. 1, p. ITC1–ITC16, jan. 2021. Acesso em: 24 fev. 2022.
16. NAOUM, P. C. Interferentes eritrocitários e ambientais na anemia falciforme. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 22, n. 1, abr. 2000. Acesso em: 24 fev. 2022.
17. SHARPE, C. C.; THEIN, S. L. Sickle cell nephropathy – a practical approach. *British Journal of Haematology*, v. 155, n. 3, p. 287–297, 9 set. 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.

18. BISWAS, S. K. Does the Interdependence between Oxidative Stress and Inflammation Explain the Antioxidant Paradox? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2016, p. 1–9, 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.
19. ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, v. 94, n. 3, p. 909–950, jul. 2014. Acesso em: 24 fev. 2022.
20. HARIRI, E. *et al.* Sickle cell nephropathy: an update on pathophysiology, diagnosis, and treatment. *International Urology and Nephrology*, v. 50, n. 6, p. 1075–1083, 30 jan. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022
21. OLANIRAN, K. O. *et al.* Sickle Cell Nephropathy in the Pediatric Population. *Blood Purification*, v. 47, n. 1–3, p. 205–213, 5 dez. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
22. ALVAREZ, O.; LOPEZ-MITNIK, G.; ZILLERUELO, G. Short-term follow-up of patients with sickle cell disease and albuminuria. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 50, n. 6, p. 1236–1239, 2008. Acesso em: 24 fev. 2022.
23. NISS, O. *et al.* Progression of albuminuria in patients with sickle cell anemia: a multicenter, longitudinal study. *Blood Advances*, v. 4, n. 7, p. 1501–1511, 14 abr. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.
24. NATH, K. A.; KATUSIC, Z. S.; GLADWIN, M. T. The Perfusion Paradox and Vascular Instability in Sickle Cell Disease. *Microcirculation*, v. 11, n. 2, p. 179–193, jan. 2004. Acesso em: 24 fev. 2022.
25. LIMA, L. C. *et al.* Fisiopatologia da doença renal crônica em adultos com doença falciforme. *Revista Hospital Universitário Pedro Ernesto*, v. 14, n. 3, 30 dez. 2015. Acesso em: 24 fev. 2022.
26. SASONGKO, T. H.; NAGALLA, S.; BALLAS, S. K. Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors for proteinuria and microalbuminuria in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley

- & Sons, Ltd, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd009191>>. Acesso em: 24 fev. 2022.
27. ROY, N. B. *et al.* Interventions for chronic kidney disease in people with sickle cell disease. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2016. . Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1002/14651858.cd012380>>. Acesso em: 24 fev. 2022.
28. ROY, S. *et al.* Angiotensin receptor signaling in sickle cell anemia has a renoprotective effect on urine concentrating ability but results in sickle glomerulopathy. *American Journal of Hematology*, v. 93, n. 7, p. E177–E181, 15 maio 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
29. Franco, R. J. S.; Proteção renal durante o tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina. *HiperAtivo*, v. 5, n. 111, p. 2, Abr/Jun 1998. Acesso em: 24 fev. 2022.
30. FITZHUGH, C. D.; WIGFALL, D. R.; WARE, R. E. Enalapril and hydroxyurea therapy for children with sickle nephropathy. *Pediatric Blood & Cancer*, v. 45, n. 7, p. 982–985, 2005. Acesso em: 24 fev. 2022.
31. QUINN, C. T. *et al.* Losartan for the nephropathy of sickle cell anemia: A phase-2, multicenter trial. *American Journal of Hematology*, v. 92, n. 9, p. E520–E528, 19 jul. 2017. Acesso em: 24 fev. 2022.
32. YEE, M. E. *et al.* Losartan therapy decreases albuminuria with stable glomerular filtration and permselectivity in sickle cell anemia. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 69, p. 65–70, mar. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022
33. SPOONER, R.; YILMAZ, Ö. The Role of Reactive-Oxygen-Species in Microbial Persistence and Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 12, n. 1, p. 334–352, 13 jan. 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.
34. LAMBETH, J. D. Nox enzymes, ROS, and chronic disease: An example of antagonistic pleiotropy. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 43, n. 3, p. 332–347, 1 ago. 2007. Acesso em: 24 fev. 2022.

35. RAVAROTTO, V. *et al.* Oxidative stress – chronic kidney disease – cardiovascular disease: A vicious circle. *Life Sciences*, v. 210, p. 125–131, out. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
36. PRASAD, A. S. Zinc: role in immunity, oxidative stress and chronic inflammation. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, v. 12, n. 6, p. 646–652, nov. 2009. Acesso em: 24 fev. 2022.
37. QUEIROZ, R. F.; LIMA, E. S. Oxidative stress in sickle cell disease. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 35, n. 1, p. 16–17, 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
38. DOMINGOS, I. F. *et al.* Evaluation of oxidative stress-related genetic variants for predicting stroke in patients with sickle cell anemia. *Journal of the Neurological Sciences*, v. 414, p. 116839, jul. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.
39. CHIRICO, E. N.; PIALOUX, V. Role of oxidative stress in the pathogenesis of sickle cell disease. *IUBMB Life*, v. 64, n. 1, p. 72–80, 30 nov. 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.
40. HERMANN, P. B. *et al.* Erythrocyte oxidative stress markers in children with sickle cell disease. *Jornal de Pediatria*, v. 92, n. 4, p. 394–399, jul. 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.
41. AMA MOOR, V. J. *et al.* Oxidative profile of sickle cell patients in a Cameroonian urban hospital. *BMC Clinical Pathology*, v. 16, n. 1, 21 set. 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.
42. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, v. 29, n. 1, p. 113–123, fev. 2006. Acesso em: 24 fev. 2022.
43. SUTTON, A. *et al.* The Ala16Val genetic dimorphism modulates the import of human manganese superoxide dismutase into rat liver mitochondria. *Pharmacogenetics*, v. 13, n. 3, p. 145, mar. 2003. Acesso em: 24 fev. 2022.

44. TAKATA, Y. *et al.* Genetic Variation in GPX1 Is Associated with GPX1 Activity in a Comprehensive Analysis of Genetic Variations in Selenoenzyme Genes and Their Activity and Oxidative Stress in Humans. *The Journal of Nutrition*, v. 142, n. 3, p. 419–426, 1 fev. 2012. Acesso em: 24 fev. 2022.
45. LIGHTFOOT T. J., *et al.* Polymorphisms In The Oxidative Stress Genes, Superoxide Dismutase, Glutathione Peroxidase And Catalase And Risk Of Non-Hodgkin's Lymphoma. *Haematologica*. v. 91, p. 1222-1227, Jan. 2006. Acesso em: 24 fev. 2022.
46. EMOKPAE, M. A.; UADIA, P. O. Association of Oxidative Stress Markers with Atherogenic Index of Plasma in Adult Sickle Cell Nephropathy. *Anemia*, v. 2012, p. 1–5, 2012b. Acesso em: 24 fev. 2022.
47. PIEL, F. B. *et al.* Global migration and the changing distribution of sickle haemoglobin: a quantitative study of temporal trends between 1960 and 2000. *The Lancet Global Health*, v. 2, n. 2, p. e80–e89, fev. 2014. Acesso em: 24 fev. 2022.
48. LINDENAU, J. D. *et al.* The effects of old and recent migration waves in the distribution of HBB*S globin gene haplotypes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 39, n. 4, p. 515–523, 3 out. 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.
49. BADR, M. *et al.* Renal tubular dysfunction in children with sickle cell haemoglobinopathy. *Nephrology*, v. 18, n. 4, p. 299–303, 27 mar. 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
50. AUDARD, V.; BARTOLUCCI, P.; STEHLÉ, T. Sickle cell disease and albuminuria: recent advances in our understanding of sickle cell nephropathy. *Clinical Kidney Journal*, v. 10, n. 4, p. 475–478, 21 abr. 2017. Acesso em: 24 fev. 2022.
51. BRETT HEIMLICH, J *et al.* Endothelin-1 contributes to the progression of renal injury in sickle cell disease via reactive oxygen species. *British Journal of Pharmacology*, v. 173, n. 2, p. 386–395, 19 dez. 2015. Acesso em: 7 mar. 2022.

52. ROY, Swarnava *et al.* Increased Oxidative Stress In Sickle Cell Disease Activates The Renin-Angiotensin-TGF- β Pathway To Mediate Sickle Nephropathy. *Blood*, v. 122, n. 21, p. 2211–2211, 15 nov. 2013. Acesso em: 7 mar. 2022.
53. SHIMODA-MATSUBAYASHI, S. *et al.* Structural Dimorphism in the Mitochondrial Targeting Sequence in the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene: A Predictive Evidence for Conformational Change to Influence Mitochondrial Transport and a Study of Allelic Association in Parkinson's Disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 229, n. 1, p. 361, dez. 1996. Acesso em: 24 fev. 2022.
54. BELISÁRIO, ANDRÉ R *et al.* Sickle cell disease nephropathy: an update on risk factors and potential biomarkers in pediatric patients. *Biomarkers in Medicine*, v. 13, n. 11, p. 965–985, ago. 2019. Acesso em: 24 fev. 2022.
55. LEITE, J. A. *et al.* ESTUDO DE VARIANTE GENÉTICA DO SOD2 NA NEFROPATIA FALCÊMICA. *Hematology, Transfusion and Cell Therapy*, v. 42, p. 44–45, nov. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.
56. JÓWKO, E. *et al.* SOD2gene polymorphism and response of oxidative stress parameters in young wrestlers to a three-month training. *Free Radical Research*, v. 51, n. 5, p. 506–516, 4 maio 2017. Acesso em: 24 fev. 2022.
57. FARIAS, I. C. C. *et al.* Association of the SOD2 polymorphism (Val6Ala) and SOD activity with vaso-occlusive crisis and acute splenic sequestration in children with sickle cell anemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*, v. 10, n. 1, p. e2018012, 21 fev. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
58. DOSUNMU-OGUNBI, A. M. *et al.* Decoding the role of SOD2 in sickle cell disease. *Blood Advances*, v. 3, n. 17, p. 2679–2687, 10 set. 2019. Acesso em: 24 fev. 2022.
59. MÖ LLSTEN, A. *et al.* A Functional Polymorphism in the Manganese Superoxide Dismutase Gene and Diabetic Nephropathy. *Diabetes*, v. 56, n. 1, p. 265–269, 1 jan. 2007. Acesso em: 24 fev. 2022.

60. ISKUSNYKH, I. Y. *et al.* Expression of Glutathione Peroxidase and Glutathione Reductase and Level of Free Radical Processes under Toxic Hepatitis in Rats. *Journal of Toxicology*, v. 2013, p. 1–9, 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
61. PAIKARI, A.; SHEEHAN, V. A. Fetal haemoglobin induction in sickle cell disease. *British Journal of Haematology*, v. 180, n. 2, p. 189–200, 16 nov. 2017. Acesso em: 24 fev. 2022.
62. NATTA, C. L.; CHEN, L. C.; CHOW, C. K. Selenium and Glutathione Peroxidase Levels in Sickle Cell Anemia. *Acta Haematologica*, v. 83, n. 3, p. 130–132, 1990. Acesso em: 24 fev. 2022.
63. RENÓ, C. O. *et al.* Biochemical Evaluation of the Effects of Hydroxyurea in Vitro on Red Blood Cells. *Antioxidants*, v. 10, n. 10, p. 1599, 12 out. 2021. Acesso em: 24 fev. 2022.
64. GIZI, A. *et al.* Assessment of oxidative stress in patients with sickle cell disease: The glutathione system and the oxidant–antioxidant status. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, v. 46, n. 3, p. 220–225, mar. 2011. Acesso em: 24 fev. 2022.
65. ANTWI-BOASIAKO, C. *et al.* Oxidative Profile of Patients with Sickle Cell Disease. *Medical Sciences*, v. 7, n. 2, p. 17, 25 jan. 2019. Acesso em: 24 fev. 2022.
66. SILVA, D. G. H. *et al.* Oxidative stress in sickle cell disease: An overview of erythrocyte redox metabolism and current antioxidant therapeutic strategies. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 65, p. 1101–1109, dez. 2013. Acesso em: 24 fev. 2022.
67. BISWAL, S. *et al.* Oxidative stress, antioxidant capacity, biomolecule damage, and inflammation symptoms of sickle cell disease in children. *Hematology*, v. 24, n. 1, p. 1–9, 16 jul. 2018. Acesso em: 24 fev. 2022.
68. ITOKUA, K. E. *et al.* Albuminuria, serum antioxidant enzyme levels and markers of hemolysis and inflammation in steady state children with sickle cell anemia. *BMC Nephrology*, v. 17, n. 1, 17 nov. 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.

69. BELISÁRIO, ANDRÉ ROLIM *et al.* Prevalence and risk factors for albuminuria and glomerular hyperfiltration in a large cohort of children with sickle cell anemia. *American Journal of Hematology*, v. 95, n. 5, 29 fev. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.
70. SHATAT, I. F. *et al.* Changes in Urine Microalbumin-to-Creatinine Ratio in Children with Sickle Cell Disease over Time. *Frontiers in Pediatrics*, v. 4, 7 out. 2016. Acesso em: 24 fev. 2022.
71. MCKIE, K. T. *et al.* Prevalence, Prevention, and Treatment of Microalbuminuria and Proteinuria in Children With Sickle Cell Disease. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 29, n. 3, p. 140–144, mar. 2007. Acesso em: 24 fev. 2022.
72. VINHAES, C. L. *et al.* Hydroxyurea treatment is associated with reduced degree of oxidative perturbation in children and adolescents with sickle cell anemia. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, 4 nov. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.
73. CHO, C.-S. *et al.* Hydroxyurea-Induced Expression of Glutathione Peroxidase 1 in Red Blood Cells of Individuals with Sickle Cell Anemia. *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 13, n. 1, p. 1–11, jul. 2010. Acesso em: 24 fev. 2022.
74. ZUMBERG, M. S. *et al.* Hydroxyurea therapy for sickle cell disease in community-based practices: A survey of Florida and North Carolina hematologists/oncologists. *American Journal of Hematology*, v. 79, n. 2, p. 107–113, 2005. Acesso em: 24 fev. 2022.
75. THORNBURG, Courtney D.; CALATRONI, Agustin; PANEPINTO, Julie A. Differences in Health-Related Quality of Life in Children With Sickle Cell Disease Receiving Hydroxyurea. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 33, n. 4, p. 251–254, maio 2011. Acesso em: 9 mar. 2022.
76. GUEYE TALL, F. *et al.* Influence of Oxidative Stress Biomarkers and Genetic Polymorphisms on the Clinical Severity of Hydroxyurea-Free Senegalese Children with Sickle Cell Anemia. *Antioxidants*, v. 9, n. 9, p. 863, 14 set. 2020. Acesso em: 24 fev. 2022.

ANEXOS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – (TCLE único)

Você está sendo convidado a participar da pesquisa intitulada "ESTUDO DA PREVALÊNCIA, PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MICROALBUMINÚRIA E PROTEINÚRIA EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS EM BELO HORIZONTE – MG", que será realizada no ambulatório da Fundação Hemominas e no Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, sob responsabilidade do Prof. Marcos Borato Viana, Profa. Ana Cristina Simões e Silva e Dr. Paulo do Val Rezende.

A doença falciforme é uma doença do sangue, causado pela alteração na forma das hemácias, as células vermelhas do sangue, que ficam parecidas com foice, ao invés de ter a forma normal arredondada. Ela é uma doença que causa diferentes sintomas nos pacientes, com casos mais leves e outros mais graves.

A piora da função dos rins é uma complicação comum e com graves consequências nos pacientes com anemia falciforme, chamada de nefropatia falciforme. Nosso objetivo nesta pesquisa é estudar a nefropatia falciforme em crianças com doença falciforme, atendidas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte, para caracterizar o início do seu desenvolvimento, descrever a sua associação com manifestações clínicas e alterações dos exames laboratoriais (exames de sangue e urina).

Ao concordar com a participação na pesquisa, você estará autorizando que os pesquisadores consultem os dados clínicos e laboratoriais de seu filho ou da criança pela qual você é responsável nos prontuários médicos. Caso você autorize, você não terá nenhum custo. Iremos colher um pouco de sangue da veia (5ml) e uma ou mais amostras de urina da criança no dia da consulta agendada para realizar os testes para o diagnóstico da nefropatia falciforme e identificação de possíveis fatores de risco para ocorrência desse evento como, por exemplo, níveis de determinadas proteínas no sangue ou urina e fatores genéticos, ou seja, aqueles presentes no DNA. Caso seja verificada presença de nefropatia, a criança será encaminhada para o Serviço de Nefrologia Pediátrica do Hospital das Clínicas da UFMG, onde será realizada consulta com um médico especialista. Neste caso o paciente e seu responsável serão consultados e orientados para avaliação do uso de enalapril. Caso esteja indicado o uso de enalapril, será feita aleatorização ("sorteio") para que a criança use apenas o enalapril ou a ele seja associado hidroxiureia. Caso a criança já esteja em uso desta medicação por outros motivos, ela não será suspensa, mesmo que o sorteio indique essa opção. Esses dois medicamentos são usados por via oral (cápsulas ou comprimidos). A forma de sua utilização, possíveis efeitos colaterais e controle médico do uso dessas medicações serão melhor esclarecidos no caso da criança necessitar o seu uso.

A coleta de sangue será feita por um profissional treinado, mas em alguns casos pode ocorrer um hematoma (cor roxa) na região do braço onde a agulha foi introduzida. Caso seja feita uma coleta de sangue para exames referentes ao acompanhamento clínico, a amostra poderá ser usada para nossa pesquisa, sem necessidade de nova coleta.

Todas as avaliações e publicações científicas serão feitas respeitando-se o segredo profissional e a proteção dos dados pessoais. Portanto, os participantes não serão identificados.

Você poderá se recusar a participar ou solicitar desligamento do projeto de pesquisa e mesmo de seu tratamento, em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem nenhum prejuízo ao cuidado de seu filho em seu atendimento e acompanhamento ambulatorial e laboratorial na Fundação Hemominas. Você não receberá remuneração por participar do estudo.

Existem benefícios diretos para os pacientes participantes da pesquisa. A detecção precoce da nefropatia falciforme seria favorecida com o uso de um exame não invasivo, pouco incômodo para a criança e seus familiares (por envolver amostras de urina). Os pacientes que apresentarem nefropatia falciforme podem receber seguimento clínico-laboratorial mais frequente e possibilidade de uso de medicações com objetivo de prevenir, minimizar a proteinúria e retardar uma evolução para insuficiência renal.

Nós responderemos a qualquer questão relativa ao estudo, agora ou em qualquer momento que for necessário. Os telefones para contato com os pesquisadores são 32484596 ou 34099772. Você também poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II, 2o andar, sala 2005. Telefone 34094592).

CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____ abaixo assinado, declaro que após ter sido convenientemente esclarecido sobre a pesquisa "ESTUDO DA PREVALÊNCIA, PREVENÇÃO E TRATAMENTO DE MICROALBUMINÚRIA E PROTEINÚRIA EM CRIANÇAS COM ANEMIA FALCIFORME ACOMPANHADAS NA FUNDAÇÃO HEMOMINAS EM BELO HORIZONTE – MG", consinto em participar na qualidade de responsável pelo paciente _____, até que eu decida em contrário.

Belo Horizonte, ____ de _____ de 20__

Responsável.....

Pesquisador.....

Paciente com idade superior a 7 anos _____



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 01812712.7.0000.5149

Interessado(a): Prof. Marcos Borato Viana
Departamento de Pediatria
Faculdade de Medicina - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 13 de outubro de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado **"Nefropatia em criança com doença falciforme"**.

- Acréscimos de estudos de poliformismos e dosagem de marcadores inflamatórios.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

