

JÉSSICA ALVES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA
OCORRÊNCIA DE ALBUMINÚRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

BELO HORIZONTE

2022

JÉSSICA ALVES DE ALMEIDA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA
OCORRÊNCIA DE ALBUMINÚRIA EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM
ANEMIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Profa. Ana Cristina Simões e Silva

Coorientador: Dr. André Rolim Belisário

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
BELO HORIZONTE
2022**

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Medicina
Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Área de Concentração Saúde da Criança e do Adolescente

Reitora: Profa. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-graduação: Prof. Fábio Alves da Silva Junior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Mário Fernando Montenegro Campos

Faculdade de Medicina

Diretor: Prof. Humberto José Alves

Vice-diretora: Profa. Alamanda Kfoury Pereira

**Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - Área de Concentração
Saúde da Criança e do Adolescente**

Coordenador Geral do Centro de Pós-Graduação

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora Geral do Centro de Pós-Graduação

Profa. Eli Lola Gurgel Andrade

Chefe do Departamento de Pediatria: Profa. Mônica Maria de Almeida Vasconcelos

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da
Criança e do Adolescente: Profa. Roberta Maia de Castro Romanelli

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde
da Criança e do Adolescente: Profa. Débora Marques de Miranda

Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Saúde da
Criança e do Adolescente:

Profa Ana Cristina Simões e Silva – Titular

Prof. Eduardo Araújo de Oliveira – Suplente

Profa. Débora Marques de Miranda– Titular

Prof. Leandro Fernandes Malloy Diniz – Suplente

Profa. Cláudia Regina Lindgren Alves – Titular

Profa. Zilma Silveira Nogueira Reais – Suplente

Profa. Juliana Gurgel Giannetti – Titular

Profa. Ivani Novato Silva – Suplente

Profa. Lêni Márcia Anchieta – Titular

Profa. Maria Cândida Ferrarez Bouzada Viana – Suplente

Roberta Maia de Castro Romanelli – Titular

Luana Caroline dos Santos – Suplente

Sérgio Veloso Brant Pinheiro – Titular

Cássio da Cunha Ibiapina – Suplente

AL447a Almeida, Jessica Alves de.
Avaliação do efeito da concentração de Óxido Nítrico na ocorrência de Albuminúria em crianças e adolescentes com Anemia Falciforme [recursos eletrônicos]. / Jessica Alves de Almeida. -- Belo Horizonte: 2022.

68f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Ana Cristina Simões e Silva.

Coorientador (a): André Rolim Belisário.

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Anemia Falciforme. 2. Nefropatias. 3. Albuminúria. 4. Óxido Nítrico. 5. Polimorfismo Genético. 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: QV 126



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA - CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
SAÚDE DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE

FOLHA DE APROVAÇÃO
**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NA OCORRÊNCIA
DE ALBUMINÚRIA
EM CRIANÇAS E ADOLESCENTES COM ANEMIA FALCIFORME**

JÉSSICA ALVES DE ALMEIDA

Dissertação de Mestrado defendida no dia 29 de agosto de 2022, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS DA SAÚDE, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde-Saúde da Criança e do Adolescente e **aprovada** pela Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação supramencionado da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes Professores Doutores: Ana Cristina Simões e Silva – Orientadora (UFMG), Marcelo Rizzatti Luizon (UFMG), Paulo do Val Rezende (HEMOMINAS) e André Rolim Belisário - Coorientador (HEMOMINAS).

Belo Horizonte, 29 de agosto de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **André Rolim Belisário, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 16:48, 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 **Marcelo Rizzatti Luizon, Professor do Magistério Superior**, em 29/08/2022, às 16:59, 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 **Paulo do Val Rezende, Usuário Externo**, em 29/08/2022, às 17:20, 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 29/08/2022, às 18:15, 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 **1717051** e o código CRC **3F81F9B7**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu muita sabedoria para conseguir chegar a mais uma conquista muito importante na minha vida e pela capacidade de cumprir meus objetivos.

Agradeço a minha orientadora Ana Cristina Simões e Silva, pela oportunidade, confiança e excelente orientação, que fez toda a diferença na execução desse mestrado.

Ao meu coorientador, André Rolim Belisário, com quem aprendi muito mais do que pesquisa, que participou efetivamente da minha formação profissional, desde a época da graduação e sempre acreditou no meu potencial.

Aos meus familiares, principalmente meus pais, Renato e Simone, que sempre me apoiaram em qualquer decisão e estiveram ao meu lado ajudando no meu crescimento pessoal e profissional.

À Samira, que nos momentos mais difíceis de insegurança e desespero esteve ao meu lado, sempre me incentivando e me fazendo acreditar que eu era capaz.

Aos meus colegas da Fundação Hemominas, que sempre me apoiaram, em especial à Fabiola Gomes que sempre esteve comigo, auxiliando nos experimentos e dando conselhos em relação ao mestrado.

Aos meus colegas do NUPAD, que nos últimos tempos estiveram comigo, me acompanhando e vendo o sofrimento e angústia dos momentos finais do mestrado.

Ao laboratório de pesquisa da Fundação Hemominas e ao laboratório LIIM da Faculdade de Medicina da UFMG, que contribuíram com a infraestrutura, equipamentos e reagentes, para a realização dos experimentos.

Às crianças com anemia falciforme, que apesar de todo o sofrimento de ter uma doença muito grave, sempre se mostraram disponíveis para contribuir com a pesquisa. Com toda certeza serão recompensadas futuramente pelo trabalho árduo dos pesquisadores.

A todas as instituições envolvidas, Fundação Hemominas, UFMG, CAPES e FAPEMIG (projeto APQ-00131-17) pela estrutura e apoio financeiro que tornaram possível a realização do projeto.

“Se a educação sozinha não transforma a sociedade, sem ela tampouco a sociedade muda”

Paulo Freire

RESUMO

Avaliação do efeito da concentração de óxido nítrico e polimorfismos do gene eNOS na ocorrência de albuminúria em crianças e adolescentes com anemia falciforme do estado de Minas Gerais

Objetivo: A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da beta globina, localizado no cromossoma 11. As manifestações clínicas da anemia falciforme são causadas pela vaso-oclusão e anemia hemolítica crônica. A liberação de hemoglobina livre na circulação, causada pela hemólise, consome óxido nítrico (NO), levando à redução da sua biodisponibilidade. A via do NO modula a gravidade da anemia falciforme, sendo que a maioria dos sintomas vasculares da doença têm origem na depleção de NO. A microalbuminúria (MA) pode afetar de 30% a 60% dos pacientes com anemia falciforme, sendo que o aumento da prevalência ocorre com o aumento da idade. O objetivo desse trabalho foi avaliar a influência dos níveis de NO e de polimorfismos do gene da eNOS na ocorrência da albuminúria em crianças e adolescentes com anemia falciforme. **Materiais e métodos:** Um corte transversal de 80 crianças foi realizado em uma coorte de 555 participantes diagnosticadas com anemia falciforme ou S β^0 talassemia pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) e acompanhadas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas. Foram selecionadas 35 crianças que apresentavam albuminúria e 45 controles, pareados por sexo e idade. A genotipagem dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 do gene eNOS foi realizada por PCR em tempo real. A quantificação urinária de nitrato (metabólito de óxido nítrico) foi realizada por meio de detecção colorimétrica. A quantificação de microalbuminúria foi realizada utilizando método turbidimétrico. Os dados clínicos e hematológicos foram retirados dos prontuários médicos. A albuminúria e albuminúria persistente foram definidas como razão albumina/creatinina na urina maior que 30 mg/g e 100 mg/g, respectivamente. **Resultados:** A população estudada foi composta por 80 crianças diagnosticadas com anemia falciforme (HbSS) que não faziam uso de hidroxiuréia (HU), por se tratar de medicação que influencia o nível de NO; a genotipagem dos polimorfismos foi realizada em amostras de DNA de 66 crianças. Das 80 crianças, 35 (43,8%) eram do sexo masculino e 45 (56,3%), do sexo feminino. A média de idade foi de 11,95 \pm 4,89 anos. Não houve associação dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 e do nível de nitrato com a ocorrência de albuminúria. Adicionalmente, não houve associação dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 e os níveis de nitrato. A frequência de albuminúria persistente foi maior (n=4/12; 33,3%) nas crianças que possuíam o genótipo GT ou TT do polimorfismo rs1799983, quando comparado com as crianças com o genótipo GG (n=6/54; 11,1%) (OR=4,0, IC95%=0,9–17,4;

p=0,074). A frequência de albuminúria persistente foi maior (n=7/29; 24,1%) nas crianças que possuíam o genótipo TC ou CC do polimorfismo rs2070744, quando comparado com as crianças com o genótipo TT (n=3/37; 8,1%) (OR=3,6, IC95%=0,8–15,4; p=0,063). O nível de HbF das crianças que apresentavam o genótipo TC ou CC do polimorfismo rs2070744 foi significativamente maior quando comparado com aquelas que possuíam o genótipo TT (p=0,024). Não houve associação significativa entre os genótipos dos polimorfismos estudados e os níveis de Hb total, HCM, VCM, leucócitos, reticulócitos e plaquetas.

Discussão: Apesar dos achados sugerirem que o alelo T do SNP rs1799983 e alelo C do SNP rs2070744 podem estar relacionados à ocorrência de albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme, estudos adicionais com número maior de participantes são necessários para esclarecer a influência de polimorfismos no gene *eNOS* na ocorrência de nefropatia falciforme. **Conclusão:** Não houve associação entre os níveis urinários de nitrato, os polimorfismos rs1799983 e rs2070744 e a ocorrência de albuminúria ou albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Palavras chave: Anemia falciforme, nefropatia falciforme, microalbuminúria, óxido nítrico, polimorfismos *eNOS*.

ABSTRACT

Evaluation of the effect of nitric oxide concentration and eNOS gene polymorphisms on the occurrence of albuminuria in children and adolescents with sickle cell anemia in the state of Minas Gerais

Objective: Sickle cell anemia is an autosomal recessive disease caused by a point mutation in the sixth codon of the beta globin gene, located on chromosome 11. The clinical manifestations of sickle cell anemia are caused by vaso-occlusion and chronic hemolytic anemia. The release of free hemoglobin into the circulation, caused by hemolysis, consumes nitric oxide (NO), leading to a reduction in its bioavailability. The NO pathway modulates the severity of sickle cell anemia, with most vascular symptoms of the disease arising from NO depletion. Microalbuminuria (MA) can affect 30% to 60% of patients with sickle cell anemia, and the prevalence increases with increasing age. The objective of this study was to evaluate the influence of NO levels and eNOS gene polymorphisms on the occurrence of albuminuria in children and adolescents with sickle cell anemia. **Materials and methods:** A cross-sectional study of 80 children was carried out in a cohort of 555 participants diagnosed with sickle cell anemia or S β 0 thalassemia by the Minas Gerais Neonatal Screening Program (PTN-MG) and followed up at the outpatient clinic of the Hemocentro de Belo Horizonte of Fundação Hemominas . We selected 35 children with albuminuria and 45 controls, matched by sex and age. Genotyping of the eNOS gene rs1799983 and rs2070744 polymorphisms was performed by real-time PCR. Urinary quantification of nitrate (nitric oxide metabolite) was performed using colorimetric detection. The quantification of microalbuminuria was performed using the turbidimetric method. Clinical and hematological data were taken from medical records. Albuminuria and persistent albuminuria were defined as a urine albumin/creatinine ratio greater than 30 mg/g and 100 mg/g, respectively. **Results:** The population studied consisted of 80 children diagnosed with sickle cell anemia (HbSS) who did not use hydroxyurea (HU), because it is a medication that influences the level of NO; genotyping of polymorphisms was performed on DNA samples from 66 children. Of the 80 children, 35 (43.8%) were male and 45 (56.3%) were female. The mean age was 11.95 \pm 4.89 years. There was no association of rs1799983 and rs2070744 polymorphisms and nitrate level with the occurrence of albuminuria. Additionally, there was no association between rs1799983 and rs2070744 polymorphisms and nitrate levels. The frequency of persistent albuminuria was higher (n=4/12; 33.3%) in children who had the GT or TT genotype of the rs1799983 polymorphism, when compared to children with the GG genotype (n=6/54; 11, 1%) (OR=4.0, 95%CI=0.9–17.4; p=0.074). The frequency of persistent albuminuria was higher (n=7/29; 24.1%) in children who had the TC or CC genotype of the

rs2070744 polymorphism, when compared to children with the TT genotype (n=3/37; 8, 1%) (OR=3.6, 95%CI=0.8–15.4; p=0.063). The HbF level of children who had the TC or CC genotype of the rs2070744 polymorphism was significantly higher when compared to those who had the TT genotype (p=0.024). There was no significant association between the genotypes of the polymorphisms studied and the levels of total Hb, HCM, MCV, leukocytes, reticulocytes and platelets. **Discussion:** Although the findings suggest that the T allele of SNP rs1799983 and C allele of SNP rs2070744 may be related to the occurrence of persistent albuminuria in children with sickle cell anemia, additional studies with a larger number of participants are necessary to clarify the influence of polymorphisms in the gene eNOS in the occurrence of sickle cell nephropathy. **Conclusion:** There was no association between urinary nitrate levels, rs1799983 and rs2070744 polymorphisms and the occurrence of albuminuria or persistent albuminuria in children with sickle cell anemia in the state of Minas Gerais.

Keywords: Sickle cell anemia, sickle cell nephropathy, microalbuminuria, nitric oxide, eNOS polymorphisms.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura da molécula de hemoglobina	22
Figura 2: Distribuição e frequência do alelo β^S no mundo.....	23
Figura 3: Frequência do alelo β^S nas diferentes regiões do Brasil	24
Figura 4: Representação esquemática do processo de falcização da HbS diante da baixa concentração de oxigênio	25
Figura 5: Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme.....	26
Figura 6: Hemólise intravascular e biodisponibilidade do NO na doença falciforme.	27
Figura 7: Esquematização da fisiopatologia da nefropatia falciforme.....	32
Figura 8: Vasodilatação provocada por influência de NO	34
Figura 9: Fluxograma de seleção dos pacientes.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variação etária da frequência com que ocorrem algumas manifestações comuns da doença falciforme.....	29
Tabela 2: Características laboratoriais da anemia falciforme.	30
Tabela 3: Estágios da DRC de acordo com o RFG	33
Tabela 4: Distribuição por sexo e faixa etária da população do estudo no momento da coleta de amostras.	45
Tabela 5: Frequência genotípica dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais..	45
Tabela 6: Frequência de albuminúria e albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.	46
Tabela 7: Avaliação da associação entre a ocorrência de albuminúria e polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.	47
Tabela 8: Avaliação da associação entre a ocorrência de albuminúria persistente e polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.	48
Tabela 9: Avaliação da associação entre os níveis urinários de nitrato com a ocorrência de albuminúria e com os polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.	49
Tabela 10: Avaliação da associação entre os polimorfismos genéticos e os marcadores laboratoriais.	49

LISTA DE ABREVIATURAS

Ach – Acetilcolina

AVC – Acidente vascular cerebral

Ben – Benin

Ca²⁺ - Cálcio

Cam – Camarões

CAR – Central African Republic

cGMP – Guanosina monofosfato cíclico

CHCM – Concentração de hemoglobina corpuscular média

DRCT – Doença renal crônica terminal

EDRF – *Endothelium derived relaxing fator* - Fator relaxante derivado do endotélio

E-Selectina – Molécula de Adesão Endotelial

GC – Guanilato ciclase

Glu – Ácido glutâmico

GTP – Guanosina trifosfato

Hb A – Hemoglobina do adulto

Hb F – Hemoglobina fetal

HbS – Hemoglobina S

HbSS – Homozigossidade para o alelo S

HU - Hidroxiureia

ICAM-1 – Molécula de Adesão Intercelular

LDH – Lactato desidrogenase

MA – Microalbuminúria

NO – *Nitric Oxide* – Óxido nítrico

NOS - *Nitric Oxide synetase* – Óxido nítrico sintetase

Nupad – Núcleo de Ações em Pesquisa e Apoio Diagnóstico

O₂ – Oxigênio

O₂⁻ - Superóxido

ONOO – Peroxinitrito

PTN-MG – Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais

RFG – Ritmo de Filtração Glomerular

SEA – Sequestro esplênico agudo

Sen - Senegal

SNP - *Single Nucleotide Polymorphism* – Polimorfismo de nucleotídeo único

STA – Síndrome torácica aguda

SUS – Sistema Único de Saúde

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Val – Valina

VCAM-1 – Molécula de Adesão Vascular 1

VCM – Volume Corpuscular Médio

XAO – Xantina oxidase

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	19
2- REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1- Doença falciforme	21
2.2- Doença falciforme no Brasil	23
2.3- Fisiopatologia da doença falciforme.....	25
2.4- Características clínicas e laboratoriais da doença falciforme	28
2.5- Nefropatia falciforme.....	31
2.6- Óxido nítrico.....	34
2.7- Efeitos da depleção de óxido nítrico na anemia falciforme	35
2.8 - Polimorfismos genéticos e níveis de óxido nítrico.....	36
3- OBJETIVOS.....	38
3.1 – Objetivo Geral	38
3.2 – Objetivos específicos	38
4- MATERIAIS E MÉTODOS	39
4.1 – Delineamento e local do estudo.....	39
4.2 – Caracterização da população estudada.....	39
4.3 – Critérios de inclusão.....	40
4.4 – Critérios de exclusão.....	40
4.5 – Variáveis hematológicas	41
4.6 – Variáveis genéticas	42
4.7 – Análises laboratoriais	43
4.7.1 - Quantificação de metabólitos do óxido nítrico.....	43
4.8 – Variável resposta	43
4.8.1 - Detecção de albuminúria e creatina em amostras de urina	43
4.9 – Análise estatística	44

4.10 – Aspectos éticos	44
5- RESULTADOS	45
5.1 – Características da população do estudo	45
5.2 – Variáveis genéticas	45
5.3 – Análise da presença de albuminúria e albuminúria persistente na população estudada.....	46
5.4 – Avaliação da associação entre albuminúria e os polimorfismos genéticos do gene da eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais	47
5.5 – Avaliação da associação entre albuminúria persistente e os polimorfismos genéticos do gene da eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.....	48
5.6 – Avaliação da associação entre os níveis urinários de nitrato/nitrito, polimorfismos genéticos do gene eNOS e albuminúria em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.....	48
5.7 – Variáveis genéticas e marcadores laboratoriais.....	49
6- DISCUSSÃO.....	50
7- CONCLUSÕES.....	53
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
9- ANEXOS.....	60
9.1 – Anexo 1: Comprovante de aprovação no comitê de Ética em Pesquisa.....	60
9.2 – Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	66

1- INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A anemia falciforme é uma doença autossômica recessiva causada por uma mutação pontual no sexto códon do gene da beta globina, localizado no cromossoma 11. A mutação leva à troca do nucleotídeo adenina por timina (GAG → GTG), que resulta na substituição do aminoácido ácido glutâmico por valina, na sexta posição da cadeia polipeptídica [Glu6Val, rs334] (1).

A anemia falciforme é caracterizada pela homozigose do alelo mutante β S (HbSS). A doença falciforme é um termo mais amplo, que engloba a associação da HbS com outras hemoglobinas variantes como, por exemplo, hemoglobinopatias SC, SD e S β -talassemia. Todas essas hemoglobinopatias têm uma epidemiologia, aspectos clínicos e hematológicos semelhantes, apesar da anemia falciforme apresentar um quadro clínico e hematológico frequentemente mais grave do que os demais genótipos (2,3).

O Ministério da Saúde estimou que existam cerca de 60.000 a 100.000 indivíduos com anemia falciforme no Brasil, com o surgimento de 3.500 novos casos a cada ano. Atualmente, em virtude de sua prevalência e morbidade associada, a anemia falciforme constitui um problema de saúde pública no Brasil (4,5).

A anemia falciforme apresenta ampla diversidade fenotípica, que pode ser influenciada por fatores socioeconômicos, ambientais, coexistência com alfa talassemia e outros fatores genéticos como, por exemplo, polimorfismos no gene da eNOS, que foram associados a variação nos níveis de óxido nítrico (NO) (6–8).

As manifestações clínicas da anemia falciforme são causadas pela vaso-occlusão e anemia hemolítica crônica. A liberação de hemoglobina livre na circulação, causada pela hemólise, consome NO, levando à redução da sua biodisponibilidade. Além disso, a hemólise amplifica o processo fisiopatológico responsável pelas manifestações clínicas da doença, como a nefropatia falciforme (9).

A nefropatia falciforme é uma manifestação clínica crônica da anemia falciforme que causa anormalidades estruturais e funcionais nos rins, como consequência da hipertrofia glomerular e da albuminúria progressiva, que podem

resultar em glomeruloesclerose segmentar e focal. O início dos sintomas da nefropatia falciforme podem ser observados ainda na infância, com agravamento de acordo com o aumento da idade (10).

Alguns estudos indicam que até 50% dos pacientes com anemia falciforme tem disfunção endotelial devido à baixa disponibilidade de NO endógeno. A redução da biodisponibilidade de NO, causa o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento da expressão de moléculas de adesão. Tal mecanismo contribui para a ocorrência de complicações da anemia falciforme, incluindo a nefropatia (7,11).

A via do NO modula a gravidade da anemia falciforme, sendo que a maioria dos sintomas vasculares da doença tem origem na depleção de NO. Grande parte dos estudos que avaliam o NO como fator modulador do fenótipo da anemia falciforme foram realizados em populações estrangeiras e com pacientes adultos. Além disso, ainda não existem muitos estudos que demonstrem que diferentes concentrações de NO exercem efeito na expressão clínica da nefropatia falciforme.

Embora os efeitos da depleção de NO na gravidade da anemia falciforme estejam bem descritos na literatura científica, as bases moleculares das variantes genéticas do gene da eNOS na ocorrência da nefropatia falciforme, ainda não estão bem definidas (7,12,13).

Existem polimorfismos de nucleotídeo único (em inglês *single nucleotide polymorphism*; SNP) no gene da eNOS que têm sido considerados clinicamente relevantes, pois são responsáveis pela variação nos níveis de produção de NO. Os polimorfismos T-786C (rs2070744) e Glu298Asp (rs1799983) têm sido associados a vários distúrbios vasculares, como infarto agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral, trombose e doença renal (7). Em estudos prévios, esses polimorfismos foram associados a doença cardiovascular em pacientes com anemia falciforme (13,14).

Poucos estudos avaliaram a concentração de NO na anemia falciforme em pacientes brasileiros (14,15). No estado de Minas Gerais, não existe nenhum estudo avaliando a variabilidade genética dos polimorfismos do gene da eNOS nos pacientes com anemia falciforme, tampouco a influência desses polimorfismos na ocorrência de nefropatia falciforme.

O entendimento da modulação dos níveis de NO é de grande relevância, pois propiciará melhor compreensão dos efeitos do NO e das suas variantes

genéticas na ocorrência da nefropatia falciforme em crianças e adolescentes com anemia falciforme, bem como gerar informações relevantes sobre a fisiopatologia do evento, que podem ser usados para a criação de novos alvos terapêuticos para evitar ou retardar a progressão da doença.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1- Doença falciforme

As Doenças falciformes são descritas como um conjunto de genótipos caracterizados pela presença de um alelo β^S e a concentração de HbS acima de 50%. A anemia falciforme é considerada a hemoglobinopatia mais prevalente, totalizando mais de 80% dos casos (16,17).

A anemia falciforme é determinada pela forma homozigótica da HbS (HbSS), é a uma das doenças hereditárias mais comuns do Brasil, além de apresentar maior gravidade clínica e hematológica em relação aos outros genótipos de doença falciforme. A anemia falciforme é caracterizada por uma mutação no gene que codifica a cadeia da beta globina, localizada no cromossoma 11. Essa mutação leva a troca do aminoácido ácido glutâmico pela valina, na posição 6 da cadeia da beta globina, que dá origem a HbS. A substituição do aminoácido na cadeia polipeptídica provoca alterações na propriedade da hemoglobina, provocando polimerização da HbS, quando desoxigenada (16,18).

A hemoglobina humana é uma proteína globular tetramérica composta por dois pares de cadeias polipeptídicas, alfa e beta, cuja os genes estão localizados no cromossomo 16 e 11, respectivamente. A molécula $\alpha_2\beta_2$ forma a hemoglobina do adulto (HbA), cuja principal função é transportar oxigênio (O_2) dos pulmões para o tecido. Quando ocorre a mutação na cadeia beta, a HbA é substituída pela HbS. A perda de duas cargas elétricas por molécula de hemoglobina na HbS, faz com que ela possua propriedades físico-químicas muito diferentes da hemoglobina normal (Figura 1) (19).

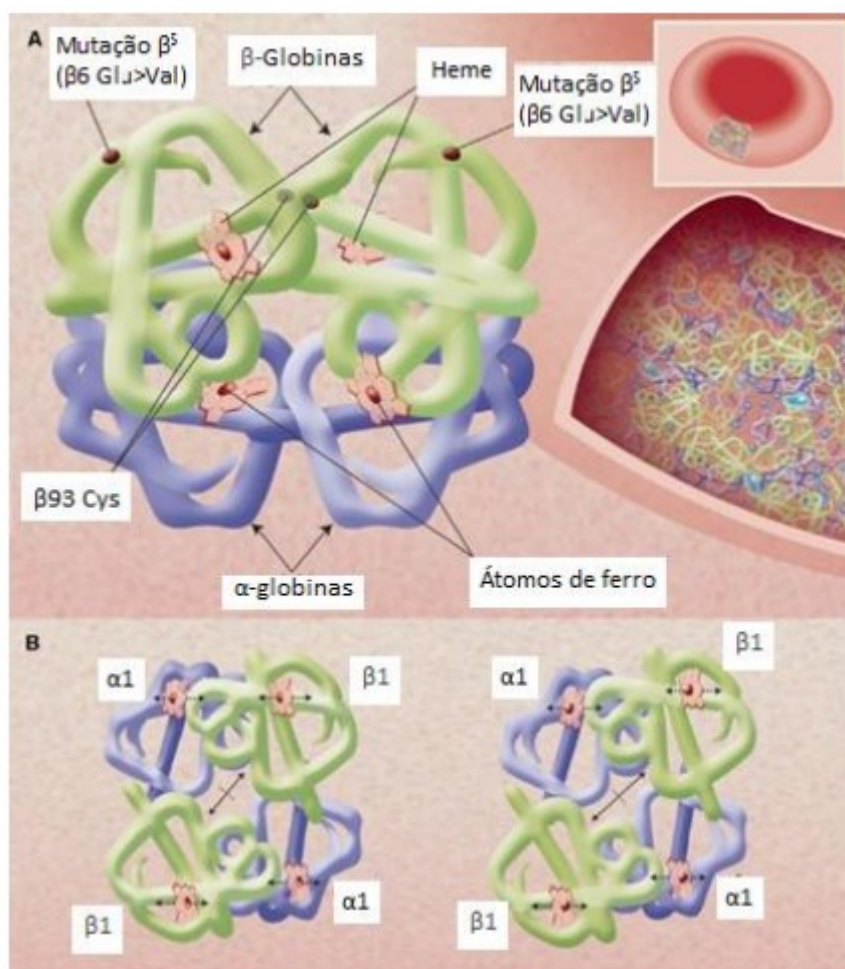


Figura 1: Estrutura da molécula de hemoglobina. (A) Representação do tetrâmero, localização dos grupos heme ligados aos átomos de ferro e posição da mutação no sexto aminoácido que origina a HbS. (B) Alteração na estrutura quaternária da HbS. Lado esquerdo oxi-HbS e no lado direito desoxi-HbS (19).

A HbS teve origem nos continentes africano e asiático, de forma independente. A distribuição global do alelo β^S é observada, primeiramente, pela adaptação dos portadores do traço falcêmico (HbAS) em relação a resistência à infecção pelo *Plasmodium falciparum*, protozoário da malária. Outro fator importante para a distribuição do alelo β^S no mundo, é o local geográfico onde a mutação ocorreu, que correspondem aos cinco haplótipos mais comuns associados ao alelo β^S . Os haplótipos mais conhecidos são República Central Africana (CAR ou Bantu), Benin (Ben), Senegal (Sen) e Camarões (Cam), originados da África e Árabe-Indiano, proveniente da Ásia (Figura 2) (1,20).

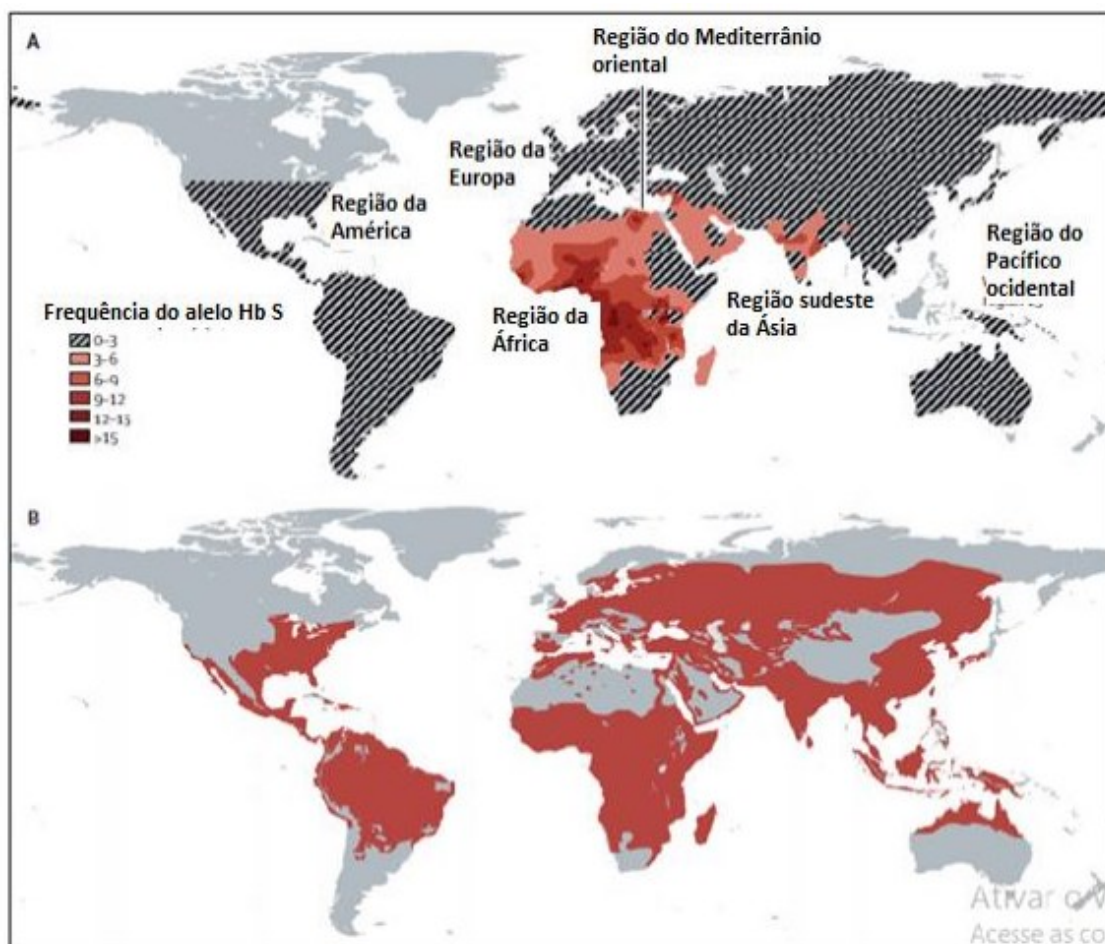


Figura 2: (A) Distribuição e frequência do alelo β^S no mundo. (B) Distribuição global da malária (20).

Estimativas sugerem que o número de nascidos vivos com doença falciforme no mundo, por ano, seja 300.000, podendo aumentar para 400.000 até 2050 (1).

2.2- Doença falciforme no Brasil

O alelo β^S foi introduzido no Brasil por meio da imigração forçada de negros africanos que ocorreu do século XVI ao século XIX. A distribuição do alelo β^S é muito heterogênea no país e depende da composição negróide e caucasóide da população. Segundo dados do Ministério da Saúde, a incidência de nascidos vivos com doença falciforme é maior nas regiões norte e nordeste, em comparação às regiões sul e sudeste (Figura 3) (5,21).

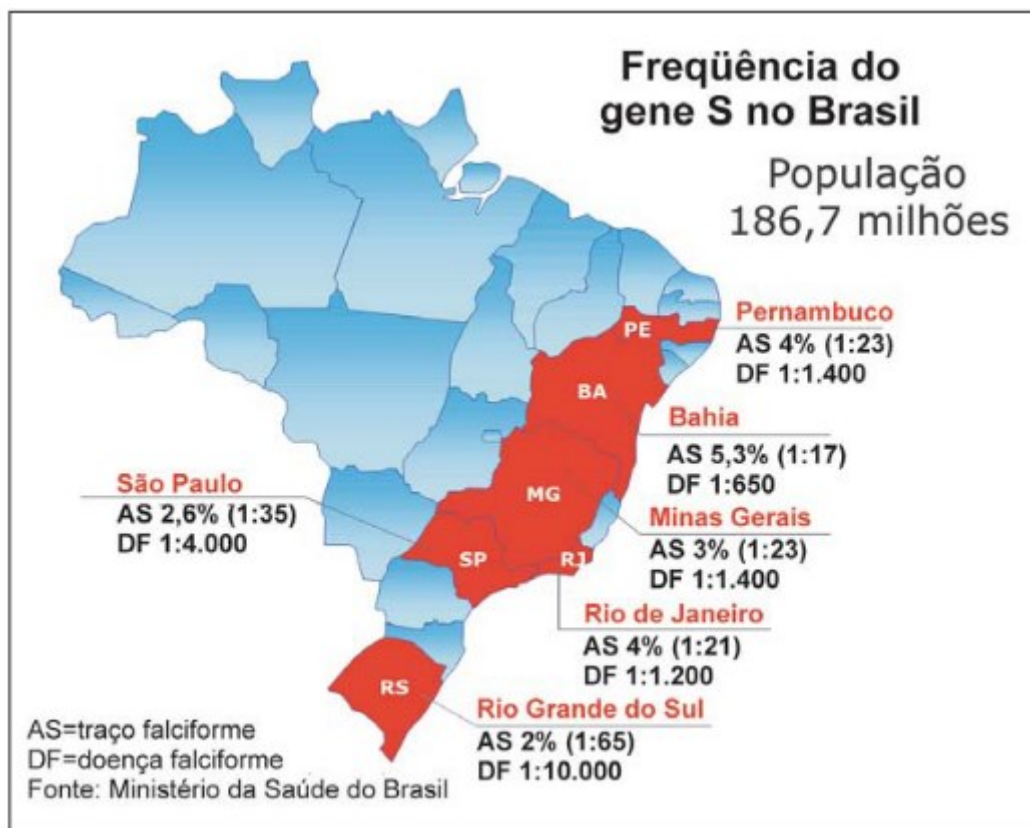


Figura 3: Freqüência do alelo β^S nas diferentes regiões do Brasil (5).

No estado de Minas Gerais, o Programa de Triagem Neonatal (PTN) estimou que a incidência de indivíduos com anemia falciforme (HbSS) é de um a cada 2.400 nascidos vivos e a incidência de indivíduos com doença falciforme é de um a cada 1.400 nascidos vivos (5,22).

Em janeiro de 1992, o ministério da saúde incorporou o Programa de Triagem Neonatal ao Sistema Único de Saúde (SUS), com testes para fenilcetonúria e hipotireoidismo congênito (Fase I), em 2001 foi incluído testes para triagem de hemoglobinopatias (Fase II), o que constitui um passo fundamental para a mudança da história natural da doença falciforme no país (5).

Anteriormente à incorporação dos testes de hemoglobinopatias ao PTN, o estado de Minas Gerais já havia incorporado o Programa Estadual de Triagem Neonatal, em março de 1998, por meio do Núcleo de Pesquisa em Apoio Diagnóstico (NUPAD), com recursos estaduais (23).

2.3- Fisiopatologia da doença falciforme

A doença falciforme produz uma diversidade de eventos fisiopatológicos, caracterizados por anemia hemolítica crônica e fenômenos vaso-oclusivos que levam a crises dolorosas agudas e a lesão tecidual sistêmica, crônica e progressiva. O processo primário desse evento é a polimerização da desoxiHbS. Sob desoxigenação ou hipóxia, a HbS forma pontes de hidrogênio entre a valina codificada como primeiro aminoácido da cadeia beta globina e a valina resultante da mutação no sexto códon. Essas pontes dão origem a um pequeno agregado de hemoglobina polimerizada, fazendo com que a hemácia sofra alterações de sua forma normal bicôncava para a forma de foice (Figura 4) (24).

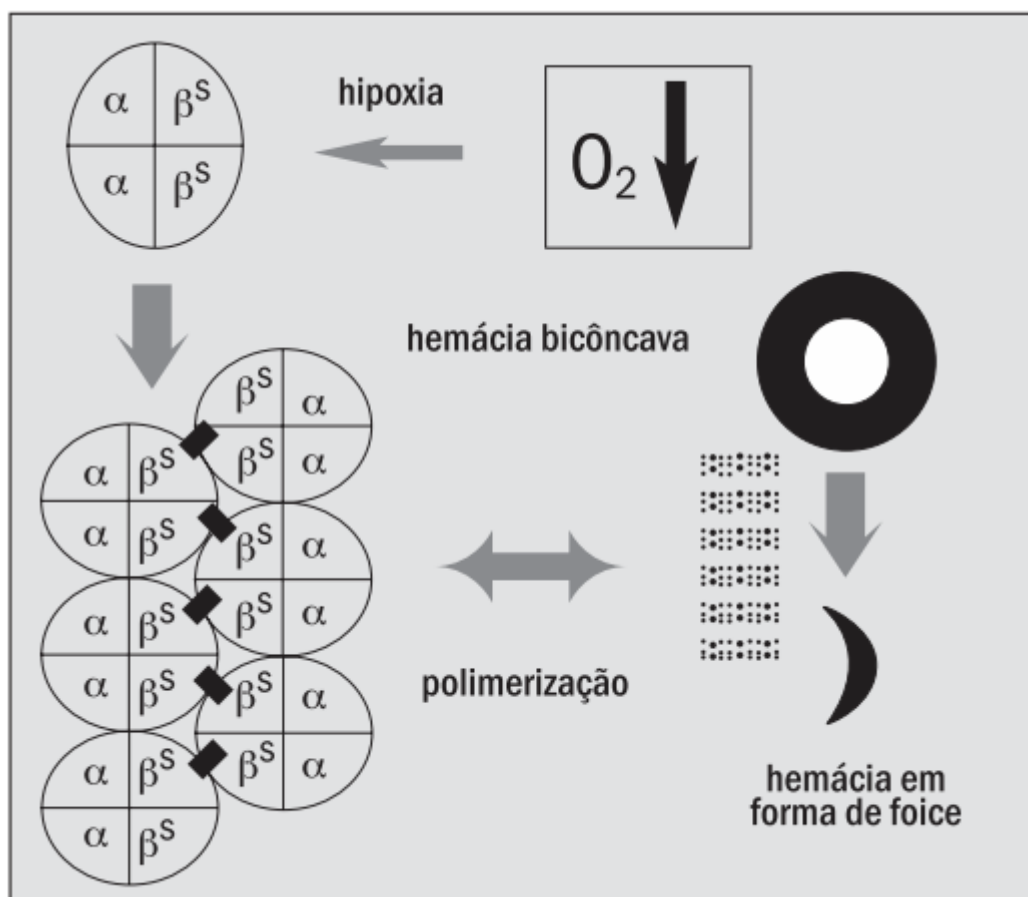


Figura 4: Representação esquemática do processo de falcização da HbS diante da baixa concentração de oxigênio (25).

Vários fatores influenciam a polimerização da HbS como, por exemplo, porcentagem de HbS intracelular, grau de desidratação, concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), composição das hemoglobinas, dentre outros (6).

O processo de falcização reflete alterações físico-químicas na membrana das hemácias, fazendo com que elas fiquem mais rígidas e aderentes à parede do endotélio vascular. Como consequência, juntamente com o recrutamento de leucócitos e plaquetas, ocorre a obstrução do fluxo sanguíneo, processo conhecido como vaso-oclusão, que desencadeia resposta inflamatória e disfunção endotelial (Figura 5) (2,6).

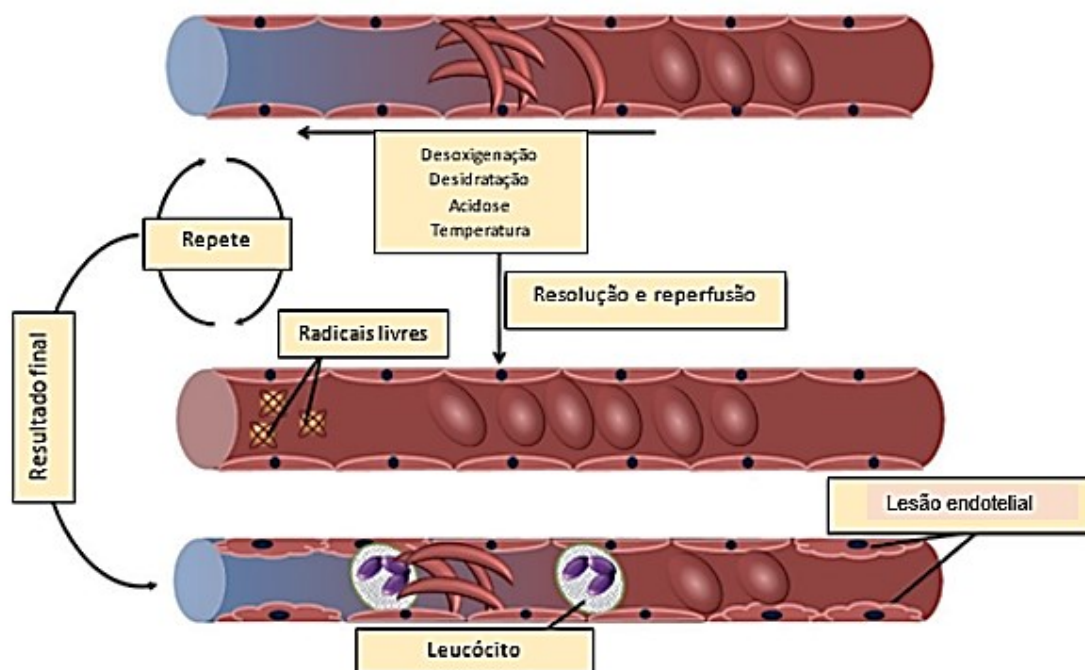


Figura 5: Mecanismo de vaso-oclusão na anemia falciforme. A falcização dos eritrócitos ocorre como resultado da desoxigenação da HbS e também por outros fatores, como desidratação, acidose e temperatura. Esse processo resulta em vaso-oclusão. Modificado de Habara et al. (2).

Com a polimerização da HbS, aumento do CHCM e das alterações de membrana, os eritrócitos são sequestrados e prematuramente destruídos pelo sistema monocítico fagocitário. Essa destruição aumentada leva à anemia hemolítica crônica, uma manifestação clínica importante da doença (24).

A hemólise ocorre principalmente de forma extra vascular, devido a eritrofagocitose por células reticuloendoteliais. No entanto, a destruição dos glóbulos vermelhos pode ocorrer por via intravascular, responsável por até 30% da hemólise total. A hemólise intravascular crônica acaba levando à saturação das proteínas de ligação à hemoglobina, permitindo que a hemoglobina livre circule. A liberação de hemoglobina livre na circulação consome NO, gerando meta-hemoglobina e nitrato bioativo, reduzindo a biodisponibilidade de NO (Figura 6) (9).

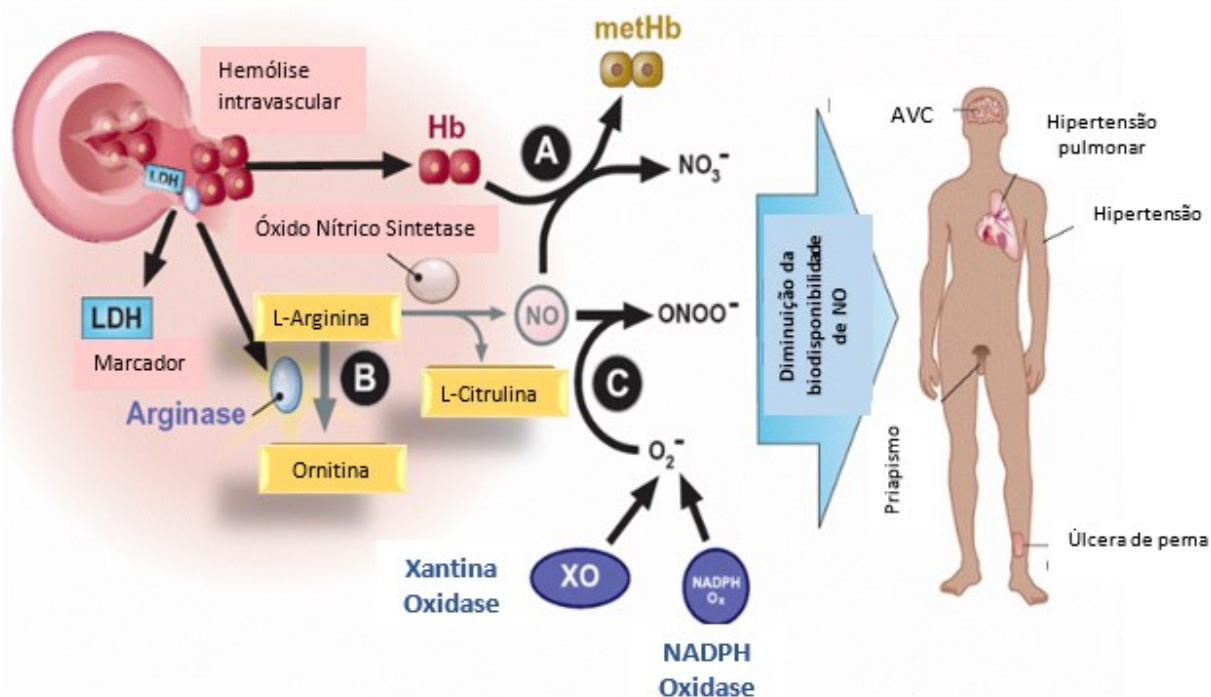


Figura 6: Hemólise intravascular e biodisponibilidade do NO na doença falciforme. A hemólise intravascular libera hemoglobina, arginase e LDH no plasma. A hemoglobina inativa o NO, gerando metemoglobina e nitrato inerte. As sintases de NO geram NO a partir do substrato L-arginina. A arginase consome L-arginina. O NO também é consumido por reações com espécies reativas de oxigênio, produzindo radicais de oxigênio como o peroxinitrito. Modificado de Steinberg et al. (9). AVC: acidente vascular cerebral.

Além disso, a hemólise causa estresse oxidativo, altera o balanço das reações de óxido-redução e amplifica o processo fisiopatológico responsável pelas manifestações clínicas da doença.

2.4- Características clínicas e laboratoriais da doença falciforme

A doença falciforme caracteriza-se por numerosas complicações que podem afetar quase todos os órgãos e sistemas. A gravidade da doença é bastante variada, desde formas leves até formas mais graves, com necessidade de internações frequentes e alta morbidade, causando prejuízo na expectativa e qualidade de vida do paciente. A variabilidade clínica é bastante diversa e pode ser influenciada por vários fatores como, por exemplo, concentrações de HbS, concentrações de hemoglobina fetal (HbF), interações com outras hemoglobinas, coexistência de talassemia alfa, dentre outros (16).

Os primeiros três meses de vida dos pacientes com doença falciforme tendem a ser assintomáticos, pois a hemoglobina prevalente nesse período é a HbF, conhecida por ser um fator protetor para as complicações da doença falciforme. Após os três meses de vida, a quantidade de HbF diminui e ocorre o aumento da concentração de HbS, causando o início de algumas complicações clínicas como sequestro esplênico agudo (SEA) e dactilite aguda, conhecida como síndrome mão-pé (16).

As crises vaso-oclusivas consistem na complicação clínica mais comum, que podem afetar pacientes de todas as idades. Em crianças até 5 anos de idade, o episódio mais observado é a dactilite, após os 30 anos de idade as crises dolorosas ficam menos frequentes e mais graves, tornando-se raras após os 40 anos. A gravidade da dor é muito variada, desde episódios moderados e transitórios, que podem durar apenas alguns minutos, até episódios generalizados que duram dias ou semanas e necessitam de internação (9,24).

Infecção bacteriana é a causa de morte mais frequente em crianças diagnosticadas com anemia falciforme, cujo principal fator de risco é a disfunção esplênica, que prejudica a síntese de anticorpos, tornando os pacientes mais vulneráveis a infecções, principalmente crianças menores de 4 anos de idade. As infecções mais comuns são por *Streptococcus pneumoniae* e *Hemophilus influenzae* (22,26).

Sequestro esplênico agudo é considerado a segunda causa de morte mais comum nos pacientes diagnosticados com anemia falciforme e ocorre principalmente em pacientes abaixo de 5 anos de idade. O sequestro esplênico

agudo é caracterizado pelo aprisionamento das hemácias no baço, com consequente aumento do órgão, quebra abrupta de hemoglobina e aumento da contagem de reticulócitos. Nos casos mais graves, os pacientes evoluem para choque volêmico e óbito em algumas horas (27,28).

Síndrome torácica aguda (STA) é a segunda causa mais frequente de hospitalização em pacientes adultos diagnosticados com anemia falciforme. Ocorre devido ao acometimento pulmonar agudo, incluindo infecção, falcização intrapulmonar e tromboembolismo da medula óssea. Ocasionalmente pode culminar em falência múltipla de órgãos. Foi constatado que níveis elevados de fosfolipase A2 no sangue estão associados à STA e pode predizer sua ocorrência (9).

A tabela 1 mostra a frequência de algumas manifestações clínicas comuns da doença falciforme em relação à idade.

Manifestação	Idade		
	0-5 anos	5-15 anos	>15 anos
Asplenia funcional	3	1	0
Auto-esplenectomia	1	2	3
Morte súbita por septicemia	3	2	1
Seqüestro esplênico	3	2	1
Dactilite	3	1	0
Síndrome torácica aguda	3	2	1
AVC isquêmico	2	1	1
AVC hemorrágico	0	1	3
Dor	1	2	3
Cálculos biliares	0	1	3
Necrose avascular	0	1	3
Retinopatia	0	0	3
Insuficiência renal	0	1	3

Tabela 1: Variação etária da frequência com que ocorrem algumas manifestações comuns da doença falciforme. (0 = ausente ou raro, 3 = máxima frequência de complicação). Modificado de Zago, et al (6).

A doença falciforme também pode apresentar sintomas crônicos, que ocorrem de maneira progressiva e se manifestam de acordo com o aumento da idade, como é o caso de problemas cardiovasculares, hipertensão pulmonar, úlceras de perna, osteonecrose, retinopatias e nefropatia falciforme (29).

A anemia falciforme é o genótipo que apresenta maior gravidade clínica e hematológica. A tabela 2 mostra algumas características laboratoriais presentes na anemia falciforme (16).

CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS	FREQUÊNCIA
HbS	80 a 100%
HbF	0 a 20%
Anemia normocítica e normocrômica	Hb: 5 a 10 g/dl
Reticulocitose	5 a 30%
Leucocitose	Durante as crises de dor
Plaquetas	Aumentadas com formas anormais
Bilirrubina indireta	Elevada (≥ 6 mg/dl)
Urobilinogênio urinário	Elevado
Hematúria	Frequente
Fosfatase alcalina sérica	Elevada nas crises de dor
Medula óssea	Hiperplasia das células eritróides

Tabela 2: Características laboratoriais da anemia falciforme. Modificado de Naoum, et al (16).

Hemólise e inflamações agudas, fenômenos recorrentes em pacientes com anemia falciforme, influenciam significativamente no aumento de marcadores inflamatórios, como a contagem global de leucócitos, plaquetas, desidrogenase láctica (LDH) e haptoglobina (30,31).

Durante as crises dolorosas, os pacientes com anemia falciforme expressam níveis aumentados de moléculas de adesão como, por exemplo, molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e molécula de adesão endotelial (E-selectina). Associado a isso, ocorre o aumento do número de plaquetas e de fatores de coagulação, como o fator de Von Willebrand, causando um estado de hipergoagulabilidade, situação frequente nos pacientes com anemia falciforme (6,9,32).

Nos pacientes com problemas renais, como a nefropatia falciforme, ocorre o aumento de substâncias vasodilatadoras como, por exemplo, prostaglandinas e óxido nítrico. Esse aumento pode causar hiperfiltração glomerular com consequente microalbuminúria e, até mesmo, proteinúria. Além disso, ocorre a oclusão dos vasos da vasa-recta e lesão dos túbulos renais, podendo ser observados, na sedimentoscopia, cilindros proteicos e deposição de ferro com degeneração do epitélio dos túbulos renais (33).

2.5- Nefropatia falciforme

A disfunção renal é uma complicação crônica comum e com graves consequências nos pacientes com anemia falciforme. Essa manifestação clínica é progressiva, iniciando-se na infância e podendo agravar com o aumento da idade (29).

Doença renal em estágio terminal (DRCT) pode ocorrer de 4,2% a 11,6% em adultos com anemia falciforme, sendo um importante fator de morte prematura nessa população (10). Doença renal crônica (DRC) pode ocorrer em até 20% dos pacientes com anemia falciforme (29).

A fisiopatologia da nefropatia falciforme ainda não é totalmente compreendida, porém, estudos mostram que o interior da medula renal, por ser um ambiente caracterizado por hipóxia, baixo pH e hipertonicidade, seja um local altamente suscetível à falcização da HbS (34). A HbS falcizada apresenta grande capacidade de se aderir à parede do endotélio, causando lesões em múltiplas estruturas do rim, incluindo glomérulos, túbulos renais e vasa-recta. Tais lesões se acompanham de isquemia e infarto das células tubulares (35).

A progressão da doença ocorre com a liberação de substâncias vasodilatadoras, como prostaglandinas e NO. Tais substâncias atuam por meio de mecanismo de *feedback* negativo no glomérulo, causando o aumento do ritmo de filtração glomerular (RFG) e microalbuminúria (MA). A hiperfiltração prolongada produzirá lesões e alterações funcionais nos rins, como glomeruloesclerose, proteinúria e eventual falência renal (Figura 7) (34,36).



Figura 7: Esquematização da fisiopatologia da nefropatia falciforme. Modificado de Lima, et al. (34).

A hiperfiltração glomerular em pacientes com anemia falciforme manifesta-se inicialmente com MA e, posteriormente, com proteinúria. Como a MA precede o desenvolvimento de proteinúria na nefropatia falciforme, sua dosagem é muito útil como marcador de lesão glomerular pré-clínica. Alguns estudos correlacionaram a ocorrência de MA com o aumento da idade, baixos níveis de hemoglobina basal e HbF, hipertensão arterial, aumento de LDH e do volume corpuscular médio (VCM) (37,38). Em um estudo analisando a população de crianças com anemia falciforme no Estado de Minas Gerais, os fatores de risco para albuminúria foram aumento da idade, aumento da contagem de plaquetas e de leucócitos e elevação do RFG (39).

A MA pode afetar de 30% a 60% dos pacientes com anemia falciforme, sendo que o aumento da prevalência ocorre com o aumento da idade (40). A MA é definida pela excreção de baixas quantidades de albumina na urina, em torno de 30 a 299mg/g na relação albumina/creatinina urinária e requer exames sensíveis para sua detecção (41). Uma das limitações da dosagem de concentração urinária de albumina para detecção de MA, é que essa concentração é influenciada pelo

volume urinário, podendo apresentar um resultado falso-negativo ou falso-positivo para MA. Esse problema pode ser solucionado utilizando o cálculo entre as concentrações de albumina e creatinina em uma amostra isolada de urina, tornando o resultado fidedigno e confiável (42).

O diagnóstico precoce de MA permite a realização de terapias preventivas para evitar a evolução progressiva da doença renal para estágios avançados de DRC (43).

A definição de DRC é fundamentada em três principais componentes: componente anatômico ou estrutural, baseado em marcadores de lesão renal; componente funcional, baseado no RFG e componente temporal. É diagnosticado como portador de DRC, qualquer indivíduo que apresentar RFG $<60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ou RFG $\geq 60\text{ml}/\text{min}/1,73\text{m}^2$, associado a um marcador de dano renal, como proteinúria, presente a pelo menos 3 meses (44).

Na tabela 3 é possível observar os cinco estágios de classificação da DRC de acordo com o RFG.

Estágio	Descrição	FG*
1	Lesão renal com FG normal ou aumentada	≥ 90
2	Lesão renal com FG levemente diminuída	60-89
3	Lesão renal com FG moderadamente diminuída	30-59
4	Lesão renal com FG severamente diminuída	15-29
5	FFR** estando ou não em terapia renal substitutiva	<15

Tabela 3: Estágios da DRC de acordo com o RFG (45).

Existem alguns fatores que precedem a DRC, como eritropoiese ineficaz, baixa concentração de hemoglobina total, proteinúria, hipertensão e hematúria. Algumas complicações da anemia falciforme são mais comuns em pacientes com DRC, tais como a doença pulmonar crônica, úlcera de membros inferiores, acidente vascular cerebral (AVC) e morte (36).

Um estudo mostrou que 4% a 18% dos pacientes com anemia falciforme evoluem para DRCT, com necessidade de diálise e transplante renal. Após o

desenvolvimento de DRCT, a média de sobrevivência desses pacientes é de apenas 4 anos, com mortalidade de 40% nos primeiros dois anos após o início da diálise (29).

2.6- Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é uma molécula gasosa de radical livre que causa vasodilatação. A síntese de NO ocorre por meio da conversão enzimática de L-arginina em L-citrulina pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS). A síntese de NO pode ser realizada por três isoformas da enzima NOS: 1) neuronal (NOS1 ou nNOS); 2) induzível (NOS2 ou iNOS); e 3) endotelial (NOS3 ou eNOS) (7,46).

O NO é um dos principais reguladores da pressão arterial, atuando como fator relaxante derivado do endotélio (EDRF). Vários hormônios e a acetilcolina (Ach) podem ativar a enzima eNOS, que se liga a receptores na célula endotelial. Essa ligação faz com que o NO produzido ative a enzima guanilato ciclase (GC), acompanhada pela conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP). O aumento dos níveis de cGMP diminui a quantidade de cálcio (Ca^{2+}) livre na célula muscular, provocando seu relaxamento, e, conseqüentemente, vasodilatação (Figura 8) (47).

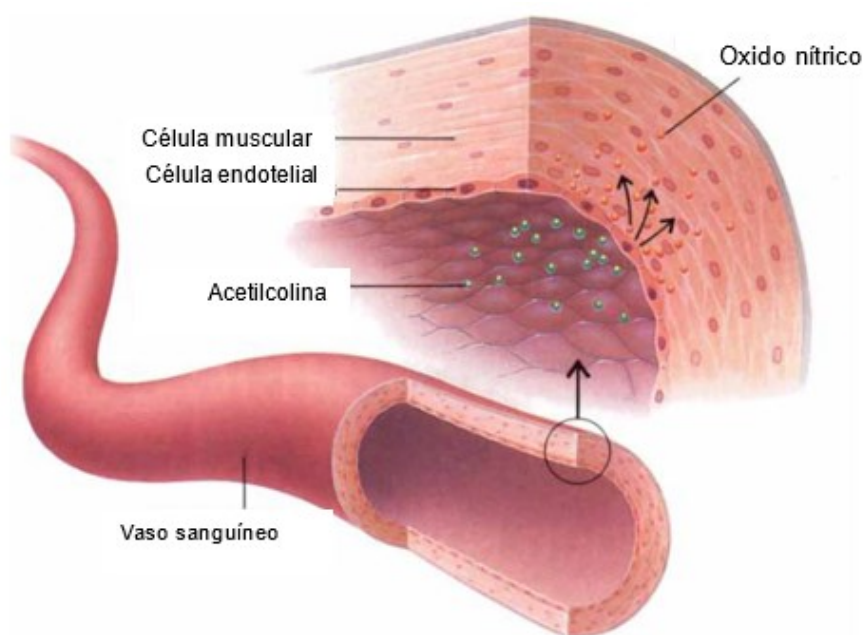


Figura 8: Os vasos sanguíneos se dilatam quando um neurotransmissor, como a acetilcolina (Ach), se liga a células endoteliais nas paredes internas do vaso. Essas células liberam fator

relaxante derivado do endotélio (EDRF), conhecido como óxido nítrico, que viaja para as células musculares adjacentes, provocando seu relaxamento. Modificado de Snyder, et al (47).

Atualmente, reconhece-se que o NO participa de muitos mecanismos fisiológicos dos vasos sanguíneos, incluindo vasodilatação tônica, inibição da ativação plaquetária e da expressão de moléculas de adesão endotelial. O NO também se mostrou, em algumas condições, capaz de melhorar a deformabilidade das hemácias, podendo desempenhar funções benéficas para pacientes com doença falciforme (46,48).

2.7- Efeitos da depleção de óxido nítrico na anemia falciforme

A liberação de hemoglobina livre na circulação, causada pela hemólise crônica, consome NO, gerando meta-hemoglobina e nitrato bioativo. O consumo de NO endotelial devido à hemoglobina plasmática livre reduz a biodisponibilidade endotelial de NO. Outro mecanismo que causa a depleção de NO é a liberação de arginase pelas hemácias lisadas. A arginase liberada quebra a L-arginina, que é o substrato para formação de NO (9).

Além do consumo de NO pela hemoglobina, a biodisponibilidade de NO pode ser prejudicada por meio do seu consumo por reações com espécies reativas de oxigênio, que são produzidas através da liberação de ferro, causada pela hemólise. Níveis elevados da atividade plasmática da xantina oxidase (XAO), que produz superóxido (O_2^-) foram detectados em pacientes com doença falciforme. O superóxido reage rapidamente com o NO para formar peroxinitrito (ONOO). Essa reação consome grande quantidade de NO, diminuindo sua biodisponibilidade (46).

A redução de NO endotelial na anemia falciforme causa o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF-alfa) e leva à ativação de moléculas de adesão, como VCAM-1, ICAM-1, P-selectina e E-selectina. Além disso, desencadeia ativação plaquetária, que por sua vez, culmina em oclusão vascular, vasoconstrição e hipercoagulabilidade (7,11).

A redução da biodisponibilidade de NO acelera a falcização das hemácias, prejudica o fluxo sanguíneo e promove lesão isquêmica na doença falciforme. Níveis baixos de metabólitos de NO se associam com escores de dor mais altos

em pacientes com doença falciforme que procuram o serviço médico de saúde com crises dolorosas agudas, sugerindo que a menor produção de NO está associada à crise vaso oclusiva mais grave (49).

Além disso, a biodisponibilidade reduzida de NO devido à hemólise intravascular produz muitas complicações e tem sido associada a ocorrência de hipertensão pulmonar, priapismo, úlcera de perna, AVC, DRC, dismotilidade esofágica e dor abdominal em pacientes com anemia falciforme (7).

2.8 - Polimorfismos genéticos e níveis de óxido nítrico

A influência dos polimorfismos (SNPs) T-786C (rs2070744) e Glu298Asp (rs1799983) localizados no gene da eNOS e responsáveis pela variação na produção de NO, tem sido estudada em várias populações.

O SNP rs2070744 (T-786C) está localizado na região promotora e provoca diminuição na produção de NO devido à redução na expressão do gene da eNOS e, conseqüentemente, na atividade da enzima (13,15). De acordo com Nishank e colaboradores, esse SNP foi associado à ocorrência de STA em crianças de regiões mediterrâneas e afro-americanas com doença falciforme de ambos os sexos (7). Em contrapartida, Sharan e colaboradores, associaram esse mesmo SNP à ocorrência de STA apenas em mulheres, sugerindo que existem diferentes modificadores genéticos de STA em homens e mulheres e que o SNP rs2070744 pode ser o primeiro polimorfismo a ser identificado como um modificador específico de gênero na doença falciforme (13).

O SNP rs1799983 (Glu298Asp) está localizado no éxon 7 e resulta de uma substituição do aminoácido Glu pelo Asp no códon 298 que também pode afetar a atividade da eNOS. Porém, a variante contendo a substituição é mais susceptível à clivagem proteolítica (50). Aguiar e colaboradores, observaram que esse polimorfismo não tem um grande efeito na atividade da eNOS, no entanto, associaram a presença do alelo T com pré-eclâmpsia e doença cardíaca isquêmica em pacientes com doença falciforme, reforçando a importância clínica desse polimorfismo. Aguiar e colaboradores também associaram os SNPs rs2070744 e rs1799983 ao aumento de reticulócitos e LDH em pacientes com anemia falciforme (8).

Tanus-Santos e colaboradores observaram que há uma diferença entre grupos étnicos em relação a distribuição dos SNPs do gene da eNOS. As variantes T-786C e Glu298Asp foram mais comuns em caucasianos do que em afro-americanos ou asiáticos. Nesse estudo, a variante Glu298Asp foi associada diretamente ao aumento do risco de doenças cardiovasculares em caucasianos (50).

Os estudos de associação dos polimorfismos do gene eNOS na ocorrência de nefropatia falciforme são escassos. No entanto, estudos prévios associaram esses polimorfismos à nefropatia em pacientes diagnosticados com diabetes. Zanchi e colaboradores associaram o SNP rs2070744 à ocorrência de nefropatia diabética avançada em pacientes diagnosticados com diabetes do tipo 1 (12).

Com base nos estudos citados acima, foram observados que os SNPs T-786C (rs2070744) e Glu298Asp (rs1799983) do gene da eNOS podem apresentar associação com a ocorrência e gravidade de várias manifestações clínicas em pacientes com doença falciforme, incluindo doenças cardiovasculares, pulmonares e renais. No entanto, estudos adicionais com amostras maiores e incluindo outros marcadores de gravidade da doença falciforme precisam ser realizados para estabelecer o papel dessas variantes na modulação do quadro clínico da doença e na ocorrência de nefropatia falciforme nessa população.

3- OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Avaliar a influência dos metabólitos de NO e de polimorfismos do gene da eNOS na ocorrência da nefropatia em crianças e adolescentes diagnosticados com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

3.2 – Objetivos específicos

- Realizar dosagem dos níveis dos metabólitos do NO em amostras de urina de crianças e adolescentes com anemia falciforme;
- Avaliar a associação entre os metabólitos de NO e a ocorrência de albuminúria na população estudada;
- Genotipar e determinar a frequência dos polimorfismos rs2070744 e rs1799983 no gene da eNOS na população estudada;
- Avaliar a influência dos SNPs nos níveis dos metabólitos de NO e na ocorrência de albuminúria;
- Verificar a associação dos polimorfismos com fatores clínicos e hematológicos da anemia falciforme.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Delineamento e local do estudo

Trata-se de um estudo transversal que utilizou como amostra crianças diagnosticadas com anemia falciforme ou $S\beta^0$ talassemia triadas pelo Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais (PTN-MG) e acompanhadas no ambulatório do Hemocentro de Belo Horizonte da Fundação Hemominas, que fazem parte de um estudo de coorte.

4.2 – Caracterização da população estudada

A população total da coorte consiste em 555 pacientes, com perfil eletroforético compatível com HbSS ou $S\beta^0$ -talassemia, nascidas entre 01 de janeiro de 1998 e 31 de dezembro de 2014, triadas pelo PTN-MG e encaminhadas para acompanhamento clínico-laboratorial no ambulatório do HBH. O corte transversal foi realizado em 80 pacientes do estudo de coorte que não faziam uso de hidroxiureia (HU). O grupo controle foi selecionado pareado por casos. Os pacientes foram divididos em dois grupos: 1) crianças que apresentaram albuminúria e 2) crianças com anemia falciforme e albuminúria normal, pareadas por idade e sexo com o grupo albuminúria.

Todas as informações clínicas e hematológicas foram obtidas nos prontuários médicos arquivados no ambulatório do HBH e tabuladas no programa Excel (Microsoft®), em arquivo específico com atualizações sucessivas.

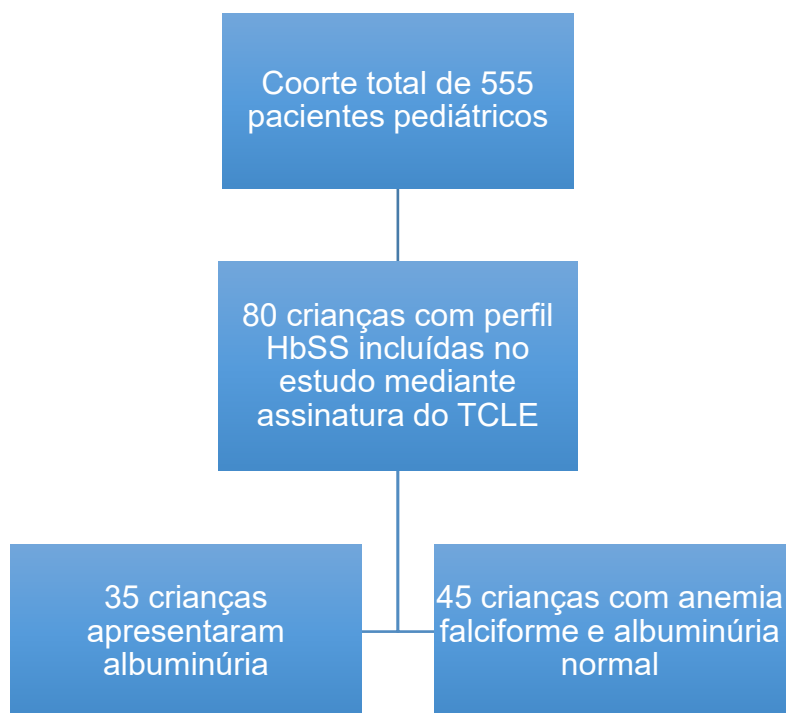


Figura 9: Fluxograma de seleção dos pacientes.

4.3 – Critérios de inclusão

- Pacientes pediátricos triados pelo PTN-MG entre janeiro de 1998 e dezembro de 2014.
- Pacientes com perfil eletroforético FS (HbSS ou S β^0 -talassemia).
- Pacientes com anemia falciforme que se encontrarem estáveis clinicamente e em controle ambulatorial no momento da coleta de amostras biológicas.
- Pacientes que não faziam uso de HU.

4.4 – Critérios de exclusão

- Pacientes maiores de 20 anos.
- Pacientes pediátricos com perfil eletroforético compatíveis com outros subtipos da doença falciforme (HbSC, HbSD, HbSE, S β^+ -Tal).
- Pacientes e/ou responsáveis que não concordaram em participar do estudo.
- Pacientes transferidos, não localizados e que evoluíram para óbito.
- Pacientes que faziam uso de HU.

4.5 – Variáveis hematológicas

Os pacientes com anemia falciforme acompanhados no ambulatório da Fundação Hemominas realizam exames hematológicos para o acompanhamento clínico de rotina, estando os resultados disponíveis no prontuário médico.

Foram estudados valores de:

- Concentração total de hemoglobina
- Concentração relativa de hemoglobina fetal
- Contagem de reticulócitos no sangue periférico
- Volume corpuscular médio (VCM),
- Hemoglobina corpuscular média (HCM),
- Leucometria basal (LEU)
- Contagem basal de plaquetas (PLAQ)

Os valores de Hb total, VCM, HCM, LEU, PLAQ e reticulócitos foram determinadas por contador eletrônico de células (CELL-DYN Ruby, Abbott Laboratories, Santa Clara, CA, USA). A quantificação da porcentagem de HbF foi realizada utilizando-se o método de eletroforese de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Para determinação do nível basal de cada parâmetro hematológico, foi considerada a média de todos os valores de exames, após os dois anos de idade, desprezando-se os valores após transfusões sanguíneas (90 dias) ou eventos clínicos significativos, como crises de dor grave, infecção grave, sequestro esplênico agudo e crise aplástica. Nos pacientes em regime de transfusão crônica ou tratamento com HU, os valores foram considerados até a data anterior ao início das respectivas condutas terapêuticas.

4.6 – Variáveis genéticas

Para extração do DNA genômico, foram realizados os seguintes procedimentos:

- As amostras de sangue coletadas em tubo contendo EDTA, foram centrifugadas a 2.000 x g em centrífuga (Herareus, Megafuge 16R, Thermo Scientific) durante 10 minutos para a separação do sangue total em plasma, leucócitos e eritrócitos.
- A partir da camada leucocitária, a extração do DNA genômico foi realizada utilizando um kit comercial (QIAamp, Qiagen), seguindo as orientações do fabricante.
- A determinação da concentração e do grau de pureza do DNA foi realizada em espectrofotômetro (NanoVueplus, GE Healthcare, Buckinghamshire,UK). Posteriormente, o DNA foi diluído para 50ng/μL, concentração utilizada nas reações de PCR.

Foram genotipados dois polimorfismos (SNPs) localizados no gene eNOS:

- -786 T>C (rs2070744), localizado na região promotora (homozigoto selvagem TT, heterozigoto TC, homozigoto recessivo CC).
- 894 G>T (rs1799983), localizado no éxon 7 (homozigoto selvagem GG, heterozigoto GT, homozigoto recessivo TT).

A análise molecular dos SNPs -786 T>C e 894 G>T foi realizada por meio de PCR em tempo real com as sondas Taqman C_15903863_10 e C_3219460_20, respectivamente, produzidas pela Thermo Fisher Scientific. As reações foram feitas a partir de 2μL de DNA, 10μL de Master Mix TaqMan® e 0,5μL da sonda assay mix. As reações de amplificação foram realizadas em um instrumento de PCR em Tempo real (modelo QuantStudio™3, Applied Biosystems, CA, EUA) nos seguintes ciclos de temperatura: 60°C por 30 segundos e 95°C por 10 minutos, seguindo-se 50 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e uma etapa final de 60°C por 30 segundos. A análise dos

resultados e determinação dos genótipos foi feita utilizando o software *genotyping*, disponível na Thermo Fisher Cloud.

4.7 – Análises laboratoriais

4.7.1 - Quantificação de metabólitos do óxido nítrico

A quantificação de nitrito/nitrato (metabólitos de óxido nítrico) foi realizada por meio de detecção colorimétrica, a partir de amostras de urina coletadas durante o controle clínico de rotina dos pacientes, no ambulatório da Fundação Hemominas. Utilizou-se o kit comercial para quantificação dos metabólitos do NO, seguindo as orientações do fabricante (Nitric Oxide Assay Kit, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Áustria). O ensaio consiste na conversão enzimática de nitrato NO₃ em nitrito NO₂ pela enzima nitrato redutase. A quantificação de nitrito/nitrato foi realizada em um leitor de microplaca da Thermo Plate (modelo TP-Reader).

4.8 – Variável resposta

4.8.1 - Detecção de albuminúria e creatina em amostras de urina

A análise de microalbuminúria foi realizada utilizando método turbidimétrico, por meio do Kit Analisa. O método se baseia na aglutinação de albumina presente na amostra de urina, juntamente com as partículas de látex recobertas por anticorpos anti-albumina humana. Quanto maior for a aglutinação, maior é a quantidade de albumina presente na amostra.

A análise de creatinina foi realizada utilizando o método cinético-colorimétrico, através do Kit Analisa. A creatinina e os interferentes presentes na amostra reagem com o picrato em meio alcalino, originando um complexo colorido. Mede-se a velocidade de formação desse complexo em períodos iniciais curtos, evitando-se assim a interferência de outros compostos.

A leitura das análises de microalbuminúria e creatinina foi realizada no analisador bioquímico semiautomático BioPlus (modelo BIO-2000).

A variável albuminúria foi analisada como categórica: presente (albuminúria maior ou igual a 30mg/g) ou ausente (albuminúria menor que 30mg/g). A

albuminúria pode ser intermitente em indivíduos com anemia falciforme. Uma vez que a razão albumina/creatinina na urina $>100\text{mg/g}$ foi recentemente associado à albuminúria persistente (51), usamos essa definição como desfecho secundário.

4.9 – Análise estatística

As variáveis contínuas foram expressas em média e desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil, conforme apropriado. Variáveis categóricas foram expressas como porcentagem do total. As variáveis foram testadas em relação à distribuição normal ou não-normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As associações entre variáveis nominais foram verificadas utilizando o teste de qui-quadrado ou teste de Fisher. As variáveis contínuas foram analisadas pelo teste T ou Mann-Whitney, conforme a distribuição normal ou não-normal, respectivamente. A análise de correlação foi realizada pelo teste de correlação de Pearson ou Spearman para variáveis com distribuição normal ou não-normal, respectivamente. Foram considerados como estatisticamente significativos os testes em que a probabilidade de erro alfa é igual ou inferior a 0,05. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS versão 21.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

4.10 – Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hemominas e pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (anexo 1).

O termo de consentimento livre esclarecido (TCLE) (anexo 2) foi apresentado aos responsáveis legais do participante, e, se necessário ao participante, caso tivesse sete anos ou mais. O estudo foi explicado aos responsáveis das crianças e adolescentes durante as consultas clínicas de rotina de forma verbal e simples, visando a total compreensão do possível participante. Quando concedida a autorização para participação, o responsável legal e o próprio participante, assinaram o TCLE, ficando sob sua guarda uma cópia e outra sob a guarda dos pesquisadores.

5- RESULTADOS

5.1 – Características da população do estudo

A população estudada foi composta por 80 crianças diagnosticadas com anemia falciforme (HbSS). Destas, 35 (43,8%) eram do sexo masculino e 45 (56,3%), do sexo feminino. A média de idade foi de $11,95 \pm 4,89$ anos (Tabela 4).

Tabela 4: Distribuição por sexo e faixa etária da população do estudo no momento da coleta de amostras.

Características	Frequência	Porcentagem
Sexo		
Feminino	45	56,30%
Masculino	35	43,80%
Idade		
1-6	17	21,30%
7-12	27	33,80%
13-17	28	35,00%
≥18	8	10,00%

5.2 – Variáveis genéticas

Dentre as 80 crianças incluídas no estudo, a genotipagem dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 foi realizada em amostras de DNA de 66 crianças (tabela 5). Os polimorfismos estudados estavam em Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$).

Tabela 5: Frequência genotípica dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Polimorfismos	Genótipos	Frequência absoluta	Frequência relativa
Genótipos do SNP rs1799983	GG	52	78,80%
	GT	12	18,20%
	TT	2	3,00%
Total		66	100%
Genótipos do SNP rs2070744	TT	37	56,10%
	TC	26	39,40%
	CC	3	4,50%
Total		66	100%

5.3 – Análise da presença de albuminúria e albuminúria persistente na população estudada

Dos 80 pacientes analisados, 45 (56,3%), apresentaram normoalbuminúria e 35 (43,8%), apresentaram albuminúria. Dos 80 pacientes analisados, 10 (12,5%) apresentaram albuminúria persistente (Tabela 6).

Tabela 6: Frequência de albuminúria e albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Características	Frequência absoluta	Frequência relativa
Albuminúria		
Normoalbuminúria	45	56,30%
Albuminúria	35	43,80%
Total	80	100%
Albuminúria persistente		
Sim	10	12,50%
Não	70	87,50%
Total	80	100%

5.4 – Avaliação da associação entre albuminúria e os polimorfismos genéticos do gene da eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais

Não houve associação significativa entre albuminúria e os genótipos dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 do gene eNOS (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação da associação entre a ocorrência de albuminúria e polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Polimorfismos	Normoalbuminúria	Albuminúria	Total	Valor de P	OR	IC95%
rs1799983						
GG	28	26	54	0,37	1,5	0,4-5,3
%	51,90%	48,10%	100%			
GT ou TT	5	7	12			
%	41,70%	58%	100%			
rs2070744						
TT	19	18	37	0,50	1,1	0,4-2,9
%	51,40%	49%	100%			
TC ou CC	14	15	29			
%	48,30%	52%	100%			

*Teste exato de Fisher

5.5 – Avaliação da associação entre albuminúria persistente e os polimorfismos genéticos do gene da eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais

Não houve associação significativa entre albuminúria persistente e os genótipos dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 (Tabela 8).

Tabela 8: Avaliação da associação entre a ocorrência de albuminúria persistente e polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Polimorfismos	Não	Sim	Total	Valor de P	OR	IC95%
rs1799983						
GG	48	6	54	0,074	4,0	0,9-17,4
%	88,90%	11,10%	100%			
GT ou TT	8	4	12			
%	66,70%	33%	100%			
rs2070744						
TT	34	3	37	0,063	3,6	0,8-15,4
%	91,90%	8%	100%			
TC ou CC	22	7	29			
%	75,90%	24%	100%			

*Teste exato de Fisher

5.6 – Avaliação da associação entre os níveis urinários de nitrato/nitrito, polimorfismos genéticos do gene eNOS e albuminúria em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais

Não houve associação significativa entre os níveis urinários de nitrato em relação à ocorrência de albuminúria ou albuminúria persistente (Tabela 9). Não houve associação significativa entre os níveis urinários de nitrato e os genótipos dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 (Tabela 9).

Todas as amostras apresentaram níveis de nitrito abaixo do limite de detecção do ensaio.

Tabela 9: Avaliação da associação entre os níveis urinários de nitrato com a ocorrência de albuminúria e com os polimorfismos genéticos do gene eNOS em crianças com anemia falciforme do estado de Minas Gerais.

Variáveis	Nitrato (Mediana e intervalo interquartil)		Valor de P
Albuminúria persistente	Sim	4,20 ± 4,97	0,3
	Não	4,44 ± 5,27	
Albuminúria Normoalbuminúria		4,90 ± 4,83	0,58
		4,36 ± 5,46	
Polimorfismos rs1799983	GG	4,41 ± 4,83	0,79
	GT ou TT	4,29 ± 3,63	
rs2070744	TT	4,22 ± 4,37	0,91
	TC ou CC	4,70 ± 4,83	

* Teste Mann-Whitney

5.7 – Variáveis genéticas e marcadores laboratoriais

Não houve associação significativa entre os genótipos do polimorfismo rs1799983 e os níveis de Hb total, HbF, HCM, VCM, leucócitos, reticulócitos e plaquetas. O nível de HbF das crianças que apresentavam os genótipos TC ou CC do polimorfismo rs2070744 foi significativamente maior quando comparado com aquelas que possuíam o genótipo TT ($p=0,024$). (Tabela 10).

Tabela 10: Avaliação da associação entre os polimorfismos genéticos e os marcadores laboratoriais.

Parâmetros	rs1799983		Valor de P	rs2070744		Valor de P
	GG	GT ou TT		TT	TC ou CC	
Hb total (g/dL)	8,02 ± 1,17	8,04 ± 1,32	0,65	8,05 ± 1,20	7,90 ± 1,23	0,94
HCM (pg)	29,39 ± 3,83	29,05 ± 5,12	0,68	28,90 ± 4,42	29,60 ± 3,66	0,76
VCM (fL)	91,65 ± 11,95	90,75 ± 7,30	0,71	91,50 ± 11,11	91,60 ± 9,20	0,66
HbF (%)	11,60 ± 9,25	13,10 ± 9,90	0,45	11,0 ± 8,0	15,90 ± 10,0	0,024
Retic (%)	12,67 ± 6,50	14,25 ± 4,38	0,55	13,0 ± 6,17	12,60 ± 6,30	0,88
WBC (mm ³)	14,75 ± 4,50	15,0 ± 3,85	0,49	14,80 ± 4,53	14,70 ± 4,12	0,81
Plaqueta (mm ³)	415,17 ± 163,15	423,38 ± 183,27	0,96	412,13 ± 163,40	424,47 ± 176,85	0,77

* Teste Mann-Whitney

Legenda: Hb: hemoglobina, HCM: hemoglobina corpuscular média, VCM: volume corpuscular médio, HbF: hemoglobina fetal, Retic: reticulócitos, WBC: Contagem de células brancas.

6- DISCUSSÃO

Uma característica importante da anemia falciforme é a heterogeneidade na gravidade do quadro clínico da doença (6). Sabe-se que a via do NO modula a gravidade da anemia falciforme, sendo que a maioria dos sintomas vasculares da doença podem ser decorrentes da depleção de NO (7). Embora os efeitos da depleção de NO na gravidade da anemia falciforme estejam bem descritos na literatura científica, ainda existem muitas controvérsias em relação as bases moleculares das variantes genéticas do gene da eNOS na ocorrência da nefropatia falciforme. A influência dos SNPs rs2070744 e rs1799983 localizados no gene da eNOS e responsáveis pela variação na produção de NO, tem sido estudada em várias populações, porém não existem muitos estudos avaliando a variabilidade genética desses SNPs em pacientes com anemia falciforme, tampouco a influência desses polimorfismos na ocorrência de nefropatia falciforme.

Este é o primeiro estudo que avalia a influência dos polimorfismos do gene da eNOS na ocorrência de nefropatia em pacientes pediátricos com anemia falciforme no estado de Minas Gerais.

Estudos previamente publicados avaliaram a associação dos polimorfismos rs1799983 e 2070744 com manifestações clínicas em pacientes com anemia falciforme. Vargas e colaboradores (2005), analisando a influência do SNP rs2070744 em pacientes brasileiros com anemia falciforme, observaram que pacientes portadores do alelo C tinham maior tendência a desenvolver um curso clínico mais grave da doença do que pacientes sem o alelo C (14). Vicky Char e colaboradores (2006), analisaram a associação dos SNPs do gene da eNOS na ocorrência de STA e crises vaso oclusivas em crianças com anemia falciforme e observaram que os portadores dos genótipos CC e TC do SNP rs2070744 apresentaram frequências mais baixas de STA do que os pacientes com o genótipo TT (52). Entretanto, Sharan e colaboradores (2004) avaliaram a associação do SNP rs2070744 com a ocorrência de STA em pacientes com anemia falciforme e observaram que o alelo C estava associado ao aumento do risco de STA apenas em mulheres. Os autores sugeriam que o SNP rs2070744 pode ser o primeiro polimorfismo identificado como um modificador específico de gênero na anemia falciforme (13).

A distribuição dos genótipos TT e CC dos SNPs rs1799983 e rs2070744, respectivamente, foi relativamente baixa na população estudada. Os polimorfismos do gene da eNOS não foram associados significativamente com a ocorrência de albuminúria, porém observou-se uma tendência de associação à ocorrência de albuminúria persistente ($p=0,074$ e $0,063$). Esses achados sugerem que o alelo T do SNP rs1799983 e alelo C do SNP rs2070744 podem estar relacionados à ocorrência de albuminúria persistente em crianças com anemia falciforme. Cabe ressaltar que o tamanho da nossa amostra foi reduzido, sobretudo em relação aos pacientes que apresentaram albuminúria persistente (10 de 80 indivíduos). Esse fato pode ter comprometido a análise, fazendo com que não fossem detectadas diferenças significativas. Em pacientes com diabetes do tipo 2, Shin e colaboradores (2004) não identificaram nenhum indivíduo com o genótipo TT, porém observaram uma deterioração mais rápida da função renal nos casos com o genótipo GT em relação ao genótipo GG (rs1799983) (53). Os autores concluíram que o genótipo GT poderia ser um preditor de sobrevida renal e um fator de risco para o desenvolvimento de ESRD em pacientes com diabetes do tipo 2 (53).

Estudos sobre associação dos polimorfismos do gene da eNOS e a ocorrência de nefropatia falciforme são escassos. A maioria dos estudos que avaliaram a associação das variáveis genéticas em eNOS com nefropatia foram realizados em pacientes com diabetes dos tipos 1 e 2. Noiri e colaboradores (2002) observaram um aumento significativo do SNP rs1799983 em pacientes com diabetes do tipo 2 que evoluíram para ESRD. Essas observações apontam para o SNP rs1799983 não apenas como um gene que poderia contribuir para a progressão da doença renal, como também um possível marcador prognóstico em pacientes com ESRD secundária a diabetes do tipo 2 (54). Mollsten e colaboradores (2009), observaram que o genótipo GG do polimorfismo rs1799983, foi protetor contra o desenvolvimento de doença cardiovascular em pacientes normoalbuminúricos, mas não em pacientes com nefropatia diabética (55). Em contrapartida, Hingorani e colaboradores (1999), observaram que o genótipo GG do polimorfismo rs1799983 foi considerado um importante fator de risco para doença cardiovascular (56).

Não houve associação significativa em relação aos níveis de nitrato com a ocorrência de albuminúria, bem como com os polimorfismos do gene da eNOS na população estudada. Em contrapartida, Nishank e colaboradores (2013) analisaram

a associação dos polimorfismos do gene da eNOS em pacientes com anemia falciforme na Índia e observaram que pacientes com anemia falciforme grave, com mutações nos SNPs do gene da eNOS, tinham níveis plasmáticos significativamente mais baixos de NO em comparação aos pacientes com anemia falciforme leve e grupo controle (7). Os autores sugeriram que o gene da eNOS poderia atuar como modulador genético do quadro clínico da doença falciforme (7).

A anemia falciforme apresenta uma variabilidade clínica e hematológica muito significativa. Várias manifestações clínicas da doença influenciam no aumento de marcadores laboratoriais, como por exemplo, episódios repetidos de hemólise, inflamações agudas e crises dolorosas. Tais episódios influenciam significativamente no aumento de moléculas de adesão e marcadores inflamatórios, como a contagem global de leucócitos, plaquetas, LDH, dentre outros (9,30). No presente estudo, não houve nenhuma associação significativa em relação ao SNP rs1799983 e marcadores laboratoriais. No entanto, o alelo C do SNP rs2070744 foi associado à concentração maior de HbF. Níveis elevados de HbF estão associados ao aumento de hemoglobina total e sobrevida de eritrócitos, além da redução da incidência de algumas intercorrências clínicas, como crises de dor, STA, úlcera de perna, colelitíase e diminuição do risco de MA em pacientes com anemia falciforme que não fazem uso de HU ou transfusão sanguínea (57–59). Vilas-Boas e colaboradores (2016) avaliaram o polimorfismo rs2070744 e as concentrações de VCAM-1 e ICAM-1 em pacientes com anemia falciforme. Os autores detectaram que os portadores do alelo recessivo C apresentavam níveis mais elevados de VCAM-1, sugerindo uma contribuição desse polimorfismo na inflamação vascular (15).

É importante reconhecer as limitações do presente estudo. Em primeiro lugar, as dificuldades na realização da pesquisa e impossibilidade de coleta de amostras dos pacientes durante a pandemia do COVID-19, que acarretaram no atraso de experimentos importantes relacionados ao projeto e impossibilitou sua realização em uma amostra maior de pacientes, prejudicando o número amostral e os resultados do trabalho. Outra limitação importante é em relação ao delineamento do estudo, o estudo transversal, realizado em uma população relativamente pequena, não permite investigar se a relação entre eles é causal ou não.

Os dados encontrados no presente estudo indicam que mais estudos são necessários, com amostras maiores, incluindo outros marcadores e analisando os

haplótipos do gene da eNOS, a fim de estabelecer o papel dessas variantes na modulação do quadro clínico da doença e na ocorrência de nefropatia em pacientes pediátricos com anemia falciforme.

7- CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os polimorfismos do gene da eNOS (rs1799983 e rs2070744) não foram associados significativamente com a presença ou persistência de albuminúria. Apesar dos achados sugerirem que o alelo T do SNP rs1799983 e alelo C do SNP rs2070744 podem estar relacionados à ocorrência de albuminúria persistente nas crianças com anemia falciforme, estudos confirmatórios são necessários.

Não houve nenhuma associação significativa entre níveis urinários de nitrato e a ocorrência de albuminúria.

Alguns estudos observaram que pacientes com anemia falciforme que apresentavam mutações nos polimorfismos do gene da eNOS, tinham níveis mais baixos de NO plasmático. No entanto, não houve associação dos polimorfismos rs1799983 e rs2070744 com níveis de nitrato neste estudo.

Apesar da grande variabilidade clínica e hematológica da anemia falciforme, não houve associação significativa entre o SNP rs1799983 e marcadores laboratoriais. No entanto, o alelo C do SNP rs2070744 associou-se à maiores concentrações de HbF.

Este estudo tem como perspectiva realizar dosagem dos níveis dos metabólitos de NO e analisar os polimorfismos rs1799983 e rs2070744 em uma amostra maior, para reavaliar a associação com a ocorrência de albuminúria persistente.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Piel FB, Steinberg MH, Rees DC. Sickle Cell Disease. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1561–73. doi: 10.1056/NEJMra1510865.
2. Habara A, Steinberg MH. Minireview: Genetic basis of heterogeneity and severity in sickle cell disease. *Exp Biol Med*. 1o de abril de 2016;241(7):689–96. doi: 10.1177/1535370216636726.
3. Rezende PV. Estudo das manifestações clínicas e hematológicas da doença falciforme subtipos SC e SD em crianças do Programa de Triagem Neonatal de Minas Gerais. *Univ Fed Minas Gerais*. 2016;1–140.
4. MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE, SECRETARIA DE CIÊNCIA. PORTARIA CONJUNTA Nº 05, DE 19 DE FEVEREIRO DE 2018. p. 1–26. Available from: http://conitec.gov.br/images/Protocolos/PCDT_DoencaFalciforme_2018.pdf.
5. Cançado RD, Jesus JA. Sickle cell disease in Brazil. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2007;29(3):204–6. doi: 10.1590/S1516-84842007000300002.
6. Zago MA, Pinto ACS. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. *Rev Bras Hematol Hemoter*. 2007;29(3):207–14. doi: 10.1590/S1516-84842007000300003.
7. Nishank SS, Singh MPSS, Yadav R, Gupta RB, Gadge VS, Gwal A. Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism is associated with sickle cell disease patients in India. *J Hum Genet*. 2013;58(12):775–9. doi: 10.1038/jhg.2013.99.
8. Aguiar L, Matos A, Gil Â, Afonso C, Almeida S, Braga L, et al. Sickle cell anemia - Nitric oxide related genetic modifiers of hematological and biochemical parameters. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2016;64(4):957-63. doi: 10.3233/CH-168008.
9. Steinberg MH. Sickle Cell Anemia, the First Molecular Disease: Overview of Molecular Etiology, Pathophysiology, and Therapeutic Approaches. *Sci World J*. 2008;8:1295–324. doi: 10.1100/tsw.2008.157.
10. Yee MM, Jabbar SF, Osunkwo I, Clement L, Lane PA, Eckman JR, et al. Chronic kidney disease and albuminuria in children with sickle cell disease. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(11):2628–33. doi: 10.2215/CJN.01600211.
11. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, et al. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. *J Am Med Assoc*.

- 2005;294(1):81–90. doi: 10.1001/jama.294.1.81.
12. Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS. Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int.* 2000;57(2):405–13. doi: 10.1046/j.1523-1755.2000.t01-1-00860.x.
 13. Sharan K, Surrey S, Ballas S, Borowski M, Devoto M, Wang KF, et al. Association of T-786C eNOS gene polymorphism with increased susceptibility to acute chest syndrome in females with sickle cell disease. *Br J Haematol.* 2004;124(2):240–3. doi: 10.1046/j.1365-2141.2003.04762.x.
 14. Vargas AE, Silva MAL, Silla L, Chies JAB. Polymorphisms of chemokine receptors and eNOS in Brazilian patients with sickle cell disease. *Tissue Antigens.* 2005;66(6):683–90. doi: 10.1111/j.1399-0039.2005.00506.x.
 15. Vilas-Boas W, Figueiredo CVB, Pitanga TN, Carvalho MOS, Santiago RP, Santana SS, et al. Endothelial nitric oxide synthase (-786T>C) and endothelin-1 (5665G>T) gene polymorphisms as vascular dysfunction risk factors in sickle cell anemia. *Gene Regul Syst Bio.* 2016;10:67–72. doi: 10.4137/GRSB.S38276.
 16. Naoum PC. Erythrocytes and environmental interferences on sickle cell anaemia. *Rev Bras Hematol E Hemoter.* 2000;22(1):5–22. doi: 10.1590/S1516-84842000000100003.
 17. Modell B. Global epidemiology of haemoglobin disorders and derived service indicators. *Bull World Health Organ.* 2008(6):480–7. doi: 10.2471/BLT.06.036673.
 18. Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-Cell Disease. *Med Genet.* 2004; 364: 1343-60. doi: 10.1016/S0140-6736(04)17192-4.
 19. Schechter AN. Hemoglobin research and the origins of molecular medicine. *Blood.* 2008;112(10):3927–38. doi: 10.1182/blood-BLOOD.
 20. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet Lond Engl.* 11 de dezembro de 2010;376(9757):2018–31. doi: 10.1016/S0140-6736(10)61029-X.
 21. Zago MA, Figueiredo MS, Ogo SH. Bantu β S cluster haplotype predominates among Brazilian blacks. *Am J Phys Anthropol.* 1992;88(3):295–8. doi: 10.1002/ajpa.1330880304.
 22. Fernandes APPC, Januário JN, Cangussu CB, Macedo DL, Viana MB. Mortality of children with sickle cell disease: a population study. *J Pediatr.* 2010;86(4):279–84. doi: 10.2223/JPED.2005.
 23. Paixão MC, Ferraz MHC, Januário JN, Viana MB, Viana MB, Lima JM. Reliability of isoelectrofocusing for the detection of hb s, hb c, and hb d in a pioneering population-based program of newborn screening in brazil.

- Hemoglobin. 2001;25(3):297–303. doi: 10.1081/HEM-100105222.
24. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Manual de Diagnóstico e Tratamento de Doenças Falciformes. 1. ed. Brasília, 2002.
 25. Neto GCG, Pitombeira MS. Aspectos moleculares da anemia falciforme. *J Bras Patol e Med Lab.* 2003;39(1):51–6. doi: 10.1590/S1676-24442003000100011.
 26. Gill FM, Sleeper LA, Weiner SJ, Brown AK, Bellevue R, Grover R, et al. Clinical events in the first decade in a cohort of infants with sickle cell disease. *Blood.* 1995;86(2):776–83. doi: 10.1182/blood.v86.2.776.bloodjournal862776.
 27. Serjeant GR, Serjeant BE. Management of Sickle Cell Disease; Lessons from the Jamaican Cohort Study. *Blood Rev.* 1993;7(3):137–45. doi: 10.1016/0268-960X(93)90001-K.
 28. Rezende P V., Viana MB, Murao M, Chaves ACL, Ribeiro ACF. Acute splenic sequestration in a cohort of children with sickle cell anemia. *J Pediatr (Rio J).* 2009;85(2):163–9. doi: 10.2223/JPED.1885.
 29. Powars DR, Chan LS, Hiti A, Ramicone E, Johnson C. Outcome of sickle cell anemia: A 4-decade observational study of 1056 patients. *Medicine (Baltimore).* 2005;84(6):363–76. doi:10.1097/01.md.0000189089.45003.52.
 30. Cerqueira BAV, Boas WV, Zanette AAD, Reis MG, Gonçalves MS. Associação de marcadores laboratoriais ao perfil clínico em pacientes com anemia falciforme de Salvador-Bahia. *Gaz.med.Bahia.* 2010;80(3):24–8.
 31. Hatzipantelis ES, Pana ZD, Gombakis N, Taparkou A, Tzimouli V, Kleta D, et al. Endothelial activation and inflammation biomarkers in children and adolescents with sickle cell disease. *Int J Hematol.* 2013;98(2):158–63. doi: 10.1007/s12185-013-1392-y.
 32. Kaul DK, Nagel RL, Chen D, Tsai HM. Sickle erythrocyte-endothelial interactions in microcirculation: The role of von willebrand factor and implications for vasoocclusion. *Blood.* 1993;81(9):2429-38. doi: 10.1182/blood.V81.9.2429.2429
 33. Jong PE, Van Eps LWS. Sickle cell nephropathy: New insights into its pathophysiology. *Kidney Int.* 1985;27(5):711–7. doi: 10.1038/ki.1985.70.
 34. Lima LC, Omena J, Lanziani R, Citelli M, Avesani CM, Cople-Rodrigues CDS. Fisiopatologia da doença renal crônica em adultos com doença falciforme. *Rev Hosp Univ Pedro Ernesto.* 2015;14(3):58–63. doi: 10.12957/rhupe.2015.19941.
 35. Silva Junior GB, Libório AB, De Francesco Daher E. New insights on pathophysiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment of sickle

- cell nephropathy. *Ann Hematol.* 2011;90(12):1371–9. doi: 10.1007/s00277-011-1327-8.
36. Derebail VK. Sick cell nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10:187-92. doi: 10.1016/B978-1-4557-4617-0.00040-6.
37. Aygun B, Mortier NA, Smeltzer MP, Hankins JS, Ware RE. Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. *Pediatr Nephrol.* 2011;26(8):1285–90.
38. Nath KA, Hebbel RP. Sick cell disease: Renal manifestations and mechanisms. *Nat Rev Nephrol.* 2015;11(3):161–71. doi: 10.1038/nrneph.2015.8.
39. Belisário AR, Almeida JA, Mendes FG, Silva DMM, Planes W, Rezende PV, et al. Prevalence and risk factors for albuminuria and glomerular hyperfiltration in a large cohort of children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2020;95(5):125–8. doi: 10.1002/ajh.25763.
40. Gargiulo R, Pandya M, Seba A, Haddad RY, Lerma E V. Sick cell nephropathy. *Disease-a-Month.* 2014;60(10):494–9. doi: 10.1016/j.disamonth.2014.08.004.
41. Imuetinyan BA, Okoeguale MI, Egberue GO. Microalbuminuria in Children With Sick Cell Anemia. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2011;22(4):733–8.
42. Zanella MT. Microalbuminúria: Fator de risco cardiovascular e renal subestimado na prática clínica. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2006;50(2):313–21. Citado em PMID: 16767297. doi: 10.1590/S0004-27302006000200017.
43. Mckie KT, Hanevold CD, Hernandez C, Waller JL, Ortiz L, Mckie KM. Prevalence , Prevention , and Treatment of Cell Disease. 2007;29(3):140–4. doi:10.1097/mph.0b013e3180335081 .
44. Bastos MG, Oliveira DCQ, Kirsztajn GM. Chronic kidney disease in the elderly. *Rev HCPA.* 2011; 31(1): 52-65.
45. Bastos MG, Bregman R, Kirsztajn GM. Doença renal crônica : frequente e grave, mas também prevenível e tratável. *Rev Assoc Med Bras.* 2010;56(2):248–53.
46. Kim-Shapiro DB, Gladwin MT. Nitric oxide pathology and therapeutics in sickle cell disease. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2018;68(2–3):223–37. doi: 10.3233/CH-189009.
47. Snyder SH, Bredt DS. Biological Roles of Nitric Oxide to be of vital physiological significance . Nitric oxide may be the first of a novel class of neurotransmitters. *Scientific American.*1992;266:68–77. Cited PMID: 1373517. doi: 10.1038/scientificamerican0592-68.

48. Kim-Shapiro DB, Schechter AN, Gladwin MT. Unraveling the reactions of nitric oxide, nitrite, and hemoglobin in physiology and therapeutics. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26(4):697–705. doi: 10.1161/01.ATV.0000204350.44226.9a.
49. Pritchard KA, Ou J, Ou Z, Shi Y, Franciosi JP, Signorino P, et al. Hypoxia-induced acute lung injury in murine models of sickle cell disease. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286(4):1–4. doi: 10.1152/ajplung.00288.2002.
50. Tanus-Santos JE, Desai M, Flockhart DA. Effects of ethnicity on the distribution of clinically relevant endothelial nitric oxide variants. *Pharmacogenetics.* 2001;11(8):719–25. doi: 10.1097/00008571-200111000-00011.
51. Niss O, Lane A, Asnani MR, Yee ME, Raj A, Creary S, et al. Progression of albuminuria in patients with sickle cell anemia: A multicenter, longitudinal study. *Blood Adv.* 2020;4(7):1501–11. doi: 10.1182/bloodadvances.2019001378.
52. Vicky Chaar M, Tarer V, Etienne-Julan M, Elion J, Diara JP, Romana M. ET-1 and eNOS gene polymorphisms and susceptibility to acute chest syndrome and painful vaso-occlusive crises in children with sickle cell anemia. *Haematologica.* 2006;91(9):1277–278.
53. Shin YS, Baek SH, Chang KY, Park CW, Yang CW, Jin DC, et al. Relations between eNOS Glu298Asp polymorphism and progression of diabetic nephropathy. *Diabetes Res Clin Pract.* 2004;65(3):257–65. doi: 10.1016/j.diabres.2004.01.010.
54. Noiri E, Satoh H, Taguchi JI, Brodsky SV, Nakao A, Ogawa Y, et al. Association of eNOS Glu298Asp polymorphism with end-stage renal disease. *Hypertension.* 2002;40(4):535–40. doi:10.1161/01.HYP.0000033974.57407.82.
55. Möllsten A, Lajer M, Jorsal A, Tarnow L. The endothelial nitric oxide synthase gene and risk of diabetic nephropathy and development of cardiovascular disease in type 1 diabetes. *Mol Genet Metab.* 2009;97(1):80–4. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.01.013.
56. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A, et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298 → Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation.* 1999;100(14):1515–20. doi: 10.1161/01.CIR.100.14.1515.
57. Bailey K, Morris JS, Thomas P, Serjeant GR. Fetal haemoglobin and early manifestations of homozygous sickle cell disease. *Arch Dis Child.* 1992;67(4):517–20. doi: 10.1136/adc.67.4.517.
58. Franco RS, Yasin Z, Palascak MB, Ciruolo P, Joiner CH, Rucknagel DL. The effect of fetal hemoglobin on the survival characteristics of sickle cells.

Blood. 2006;108(3):1073–6. doi: 10.1182/blood-2005-09-008318.

59. Lebensburger J, Johnson SM, Askenazi DJ, Rozario NL, Howard TH, Hilliard LM. Protective role of hemoglobin and fetal hemoglobin in early kidney disease for children with sickle cell anemia. *Am J Hematol.* 2011;86(5):430–2. doi: 10.1002/ajh.21994.

9- ANEXOS

9.1 – Anexo 1: Comprovante de aprovação no comitê de Ética em Pesquisa.



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

PROJETO DE PESQUISA

Título: Nefropatia em criança com doença falciforme

Área Temática:

Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 01812712.7.0000.5149

Pesquisador: Marcos Borato Viana

Instituição: PRO REITORIA DE PESQUISA ((UFMG))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 101.529

Data da Relatoria: 05/09/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo transversal, descritivo, seguido de ensaio clínico aberto. A população a ser estudada consistirá de pacientes com idade entre 3 e 18 anos, com perfil eletroforético FS, correspondente a crianças com homozigose SS ou S β 0-talassemia, em acompanhamento no ambulatório da Fundação Hemominas (FH) em Belo Horizonte. A busca de dados será desenvolvida no ambulatório da FH. O projeto propõe acompanhar o desenvolvimento da nefropatia na anemia falciforme, por meio do reconhecimento da microalbuminúria/proteinúria nas diferentes faixas etárias (entre 3 e 18 anos) de uma amostra 480 pacientes com diagnóstico de hemoglobinopatia SS/ S β 0-talassemia, nascidos entre 01 de janeiro de 1994 e 31 de dezembro de 2009, estratificados em 30 pacientes aleatorizados por cada ano de nascimento (30x16=480). Além disso, pretende avaliar a eficácia, utilidade e segurança do uso de hidroxiureia e enalapril na prevenção e tratamento da nefropatia na anemia falciforme. Todos os pacientes encontram-se em controle clinicolaboratorial regular no ambulatório da FH.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

1. Caracterizar o início do desenvolvimento da nefropatia na anemia falciforme, através do reconhecimento da microalbuminúria/proteinúria nas diferentes faixas etárias (entre 3 e 18 anos); 2. Avaliar a eficácia, utilidade e segurança do uso de hidroxiureia e enalapril na prevenção e tratamento da nefropatia na anemia falciforme.

Objetivo Secundário:

1. Avaliar a associação da nefropatia na anemia falciforme com gênero, idade, dados hematológicos e bioquímicos, co-herança de alfa-talassemia, genótipo SS ou S β 0-talassemia e intercorrências clínicas; 2. Avaliar a taxa de filtração glomerular (TFG) basal nas diferentes faixas etárias e identificar associação com microalbuminúria e proteinúria; 3. Avaliar a evolução da TFG e proteinúria com o uso de hidroxiureia/inibidor de enzima conversora de angiotensina(IECA).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Consta no projeto que não haverá riscos para os pacientes relacionados a coleta de urina, uma vez que se trata de metodologia simples e não invasiva. Os riscos relacionados à coleta de exames laboratoriais são aqueles decorrentes da punção venosa (dor ou hematoma), que são minimizados pela realização dos procedimentos por profissionais treinados e dentro das normas de segurança. Também os efeitos adversos relacionados aos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

medicamentos utilizados (variável de acordo com manifestação) são aqueles previstos nos protocolos terapêuticos empregados, os quais já indicam medidas de tratamento desses efeitos. Deve-se ressaltar que os pacientes que fizerem uso de inibidor de enzima conversora de angiotensina (IECA) e/ou hidroxiureia serão acompanhados regularmente em ambulatório especializado (Nefrologia Pediátrica/HC/UFGM e Hemominas) para monitorização do uso das medicações e de seus possíveis efeitos colaterais.

Benefícios

Com este estudo, pretende-se conhecer a prevalência da microalbuminúria/proteinúria (MA/P) e os possíveis fatores preditivos. A detecção precoce da MA/P seria portanto, um acréscimo valioso ao diagnóstico de nefropatia falciforme. Os pacientes poderiam ser beneficiados com seguimento clínico-laboratorial mais frequente e intervenções terapêuticas, como o uso de IECA e hidroxiureia, visando prevenir, minimizar a proteinúria e retardar uma evolução para insuficiência renal. Além disso, a triagem rotineira da NF seria favorecida com o uso de um exame não invasivo, pouco incômodo para a criança e seus familiares (por envolver amostra única de urina e não urina de 24 horas) e de fácil reprodutibilidade, como a pesquisa de microalbuminúria.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo proposto é classificado como de Fase IV, ou seja, pesquisas realizadas depois de comercializado o produto e/ou especialidade medicinal. Estas pesquisas são realizadas com base nas características com que foi autorizado o medicamento e/ou especialidade medicinal. Geralmente são estudos de vigilância póscomercialização, para estabelecer o valor terapêutico, o surgimento de novas reações adversas e/ou confirmação da frequência de surgimento das já conhecidas, e as estratégias de tratamento. Nas pesquisas de fase IV devem-se seguir as mesmas normas éticas e científicas aplicadas às pesquisas de fases anteriores.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação apresentada: Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do CONEP; Protocolo de Pesquisa, Parecer Consubstanciado da Câmara Departamental da Pediatria da Faculdade de Medicina da UFGM; Anuência da Unidade Funcional Patologia e Medicina Laboratorial do Hospital das Clínicas da UFGM; Parecer Consubstanciado da Unidade Funcional da Pediatria do Hospital das Clínicas da UFGM; Parecer Consubstanciado do CEP Elaborado pela Fundação Hemominas (Instituição Coparticipante); Aprovação pelo Comitê de Ética da Fundação Hemominas e TCLE.

Recomendações:

Incluir no TCLE que o COEP deverá ser consultado somente quanto as questões éticas da pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos, smj, pela aprovação do projeto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



BELO HORIZONTE, 19 de Setembro de 2012

Assinado por:
Maria Teresa Marques Amaral

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: 3134-0945

Fax: 3134-0945

E-mail: coep@prpq.ufmg.br; coep@reitoria.ufmg.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



PROJETO DE PESQUISA

Título: Nefropatia em criança com doença falciforme

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 01812712.7.0000.5149

Pesquisador: Marcos Borato Viana

Instituição: PRO REITORIA DE PESQUISA ((UFMG))

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Elaborado pela Instituição Coparticipante

Número do Parecer: 93.416

Data da Relatoria: 06/09/2012

Apresentação do Projeto:

O projeto propõe acompanhar o desenvolvimento da nefropatia na anemia falciforme, através do reconhecimento da microalbuminúria/proteinúria nas diferentes faixas etárias (entre 3 e 18 anos) de uma população de 480 indivíduos. Além disso, pretende avaliar a eficácia, utilidade e segurança do uso de hidroxiureia e enalapril na prevenção e tratamento da nefropatia na anemia falciforme.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVOS GERAIS

1. Caracterizar o início do desenvolvimento da nefropatia na anemia falciforme, através do reconhecimento da microalbuminúria/proteinúria nas diferentes faixas etárias (entre 3 e 18 anos);
2. Avaliar a eficácia, utilidade e segurança do uso de hidroxiureia e enalapril na prevenção e tratamento da nefropatia na anemia falciforme.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a associação da nefropatia na anemia falciforme com gênero, idade, dados hematológicos e bioquímicos, co-herança de α -talassemia, genótipo SS ou S α 0-talassemia e intercorrências clínicas;
2. Avaliar a TFG basal nas diferentes faixas etárias e identificar associação com microalbuminúria e proteinúria;
3. Avaliar a evolução da TFG e proteinúria com o uso de hidroxiureia/IECA.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios são descritos pelos pesquisadores. Após avaliação, considerou-se que os benefícios são maiores que os riscos apresentados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto de pesquisa é relevante e os pesquisadores responsáveis responderam todas as questões levantadas pelo CEP-Hemominas (Instituição Coparticipante).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os Termos de apresentação obrigatória foram apresentados e estão de acordo com a Resolução 196/96.

Recomendações:

Não existem recomendações relacionadas ao projeto de pesquisa.

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (313)248--4587

Fax: (313)248--4600

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

FUNDAÇÃO HEMOMINAS-MG



Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Existe uma versão do projeto distinta da publicada na Plataforma Brasil que encontra-se arquivada no CEP Hemominas com data anterior à da Carta Circular nº 122/2012/CONEP/CNS/GB/MS.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto está acordo com a Resolução 196/96 e por isso está APROVADO pelo CEP-Hemominas.

BELO HORIZONTE, 10 de Setembro de 2012

Assinado por:
Maria Clara Fernandes da Silva

Endereço: Alameda Ezequiel Dias. 321

Bairro: Santa Efigênia

CEP: 30.130-110

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (313)248--4587

Fax: (313)248--4600

E-mail: cep@hemominas.mg.gov.br

9.2 – Anexo 2: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

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 hidroxireia. 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 _____