



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

IVONE CAMARGO DAMASCENO MENDONÇA

**BIOMARCADORES DE LESÃO NA NEFROPATIA
FALCIFORME**

**ARACAJU
2012**

IVONE CAMARGO DAMASCENO MENDONÇA

**BIOMARCADORES DE LESÃO NA
NEFROPATIA FALCIFORME**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre

**ARACAJU
2012**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M539b Mendonça, Ivone Camargo Damasceno
Biomarcadores de lesão na nefropatia falciforme / Ivone
Camargo Damasceno Mendonça. – Aracaju, 2012.
70 f. : il.

Orientador (a): Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade
Federal de Sergipe, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa,
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina.

1. Albuminúria 2. Anemia falciforme 3. Lactato desidrogenase 4.
Rins – Doenças 5. Sangue – Doenças 6. Hematologia 7. Nefrologia
I. Título

CDU 616.155.194:616.61

IVONE CAMARGO DAMASCENO MENDONÇA

**BIOMARCADORES DE LESÃO NA
NEFROPATIA FALCIFORME**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Núcleo de Pós-Graduação em Medicina da
Universidade Federal de Sergipe para
obtenção do grau de Mestre em Ciências da
Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre

1º Examinador: Prof. Dr. Celso Spada - UFSC

2º Examinador: Profª Drª Rosana Cipolotti - UFS

PARECER

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Conceição e Francisco, por não medirem esforços para nos dar educação e nos ensinar a importância do estudo. A eles devo tudo o que sou.

AGRADECIMENTOS

Nada do que acontece na minha vida seria possível se não fosse o querer de um Ser superior que está no comando de tudo. E neste momento, tão importante para mim, não poderia ser diferente. Por isto agradeço a Deus, Pai e Senhor de tudo, que está presente em todos os dias da minha vida, despertando a cada dia esperança, coragem e perseverança para vencer todos os obstáculos surgidos ao longo da jornada

Que me deu uma família maravilhosa, razão do meu existir: Juliana, Fernanda e Carlos Alberto, meus amores que tiveram paciência em me suportar nos momentos de nervosismo, cansaço e assistir às minhas aulas de treinamento em casa, mesmo não entendendo nada do assunto, somente para me ajudar a adquirir mais confiança. Vocês são força, carinho e compreensão sem fim e agradeço a vocês por me fazer sentir que sou alguém com quem vocês se importam. Obrigada, meus lindos;

Que permitiu que eu tivesse uma segunda mãe, Dona Arlete, minha sogra, pessoa especial em minha vida, cujo apoio, incentivo e amor por mim foram essenciais para a conclusão deste trabalho. Obrigada por fazer parte da minha vida;

Que colocou em meu caminho, o Prof. Dr. Alexandre Sherlley, meu orientador, principal responsável por eu estar aqui agora. Obrigada, professor, pela confiança em mim depositada, pelas palavras de incentivo e por não me deixar desistir.

Que me permitiu conhecer a Prof^a Dr^a Ângela Maria, exemplo de capacidade de trabalho, seriedade, dedicação profissional, sempre disposta a colaborar. Obrigada, professora, pelo incentivo, amizade e pela força nos momentos de dificuldade. Este momento não seria possível se não fosse por sua valiosa ajuda e compreensão;

Que me cercou de pessoas que enriqueceram a minha vida profissional, como a Prof^a Dr^a Rosana Cipolotti, o Prof. Dr. Roque, que me deram dicas, me ajudaram a superar as dificuldades e colaboraram com o andamento da pesquisa e Dr. Enaldo, amigo sempre paciente, atencioso, sendo de uma importância extrema no final deste trabalho. Obrigada por tudo.

Que me permitiu ter amigos que dão o colorido no dia a dia na minha vida como Flávia, coordenadora e amiga que sempre confiou, acreditou e me incentivou a fazer

o mestrado. Reginaldo e Paulo, meus filhos do coração que seguraram a barra no setor de trabalho, nos momentos em que não pude ajudá-los. Mariana, formanda em Farmácia, amiga sempre doce e companheira, com quem tive o privilégio de compartilhar minha pesquisa. Cecília, minha cunhada e amiga especial, sempre presente com palavras de incentivo, apoio e disposta a ajudar. Obrigada por tudo;

Que me cercou de companheiros especiais como os colegas do HU, em especial: Ivina, Cândida, Fábio e Barreto que me deram dicas, compartilhando suas experiências e sempre prontos a colaborar. Obrigada pelo carinho e incentivo;

Que colocou em minha vida pessoas como Rivânia, Severo, Meyre, Pâmela, Vera, Bete, Ézio, Eliana e Fernanda, amigos que trabalharam e outros que ainda trabalham na recepção e digitação do laboratório e que nunca se negaram a receber meus pacientes da pesquisa quando eu não estava presente para fazê-lo, mesmo estando muito ocupados com outras tarefas. O meu muito obrigado pela valiosa colaboração;

Que me permitiu ter amigos como os do laboratório do Hospital da Polícia Militar de Sergipe em especial Mauricéia, Joselito e José Antão, que sempre torceram por mim. Obrigada pela amizade e espírito de coleguismo;

Que me fez conhecer Dr. Ricardo Gurgel, Isabela, Marta e Jolinda, do Núcleo de Medicina, pessoas especiais que sempre demonstraram uma disponibilidade constante para a resolução dos problemas surgidos;

Que me concedeu o privilégio de trabalhar no Hospital Universitário, onde encontrei oportunidade e incentivo para fazer o mestrado e me permitiu desenvolver minha pesquisa;

E que me fez conhecer pessoas maravilhosas e especiais, como os pacientes com anemia falciforme, que concordaram em participar pacientemente deste trabalho, sendo os verdadeiros responsáveis pelos resultados da pesquisa. Obrigada pela colaboração.

Que Deus, Pai Todo Poderoso, abençoe a todos! Com vocês divido esta conquista.

RESUMO

A Anemia Falciforme é uma desordem da hemoglobina de caráter genético, mais comum em todo o mundo, caracterizada pela presença da hemoglobina anormal S. Os fenômenos de vaso-oclusão e anemia característicos da doença causam danos aos tecidos levando à lesão de órgãos, entre eles os rins. Os vários tipos de anormalidades renais ocorrem principalmente na medula renal. Manifestações clínicas de nefropatia falciforme começam cedo, muitas vezes antes de um ano de idade com hiperfiltração glomerular, hipostenúria, acidose tubular renal distal e, ao longo do tempo, aumento de albuminúria. A desidrogenase láctica (DHL) é considerada um marcador útil de hemólise e seus níveis encontram-se bastante elevados na presença de hemólise intravascular, sendo apontada por alguns autores como associadas a várias complicações relacionadas à hemólise, inclusive complicações renais. Com o objetivo de identificar variáveis laboratoriais associadas à lesão renal em portadores de anemia falciforme, foi realizado um estudo transversal em crianças, adolescentes e jovens adultos, atendidos no ambulatório de hematologia do HU-UFS, no período de outubro de 2010 a junho de 2011. Exames laboratoriais foram realizados em 124 pacientes com anemia falciforme, idade média de $13,3 \pm 6,4$ anos (2 a 32 anos), 56,5 % do sexo masculino. Observou-se uma frequência de microalbuminúria e proteinúria de 19,4 % e 18,5 % respectivamente. A frequência de hiperfiltração glomerular foi de 63,7 %. Elevação de DHL ocorreu em 95 % dos pacientes e correlacionou-se positivamente com a microalbuminúria, com a contagem de reticulócitos e inversamente com taxas médias de hemoglobina. Apesar de a análise univariada revelar uma correlação positiva significativa entre os níveis de DHL e microalbuminúria, estes valores não foram significativamente diferentes entre os pacientes com ou sem de microalbuminúria, sugerindo que a associação com lesão renal não é específica, uma vez que houve também associação com marcadores de hemólise. Conclui-se que, níveis de DHL apresentam variabilidade de forma independente da microalbuminúria, pois níveis de DHL não foram capazes de discriminar pacientes com ou sem microalbuminúria.

Descritores: Albuminúria; anemia falciforme; lactato desidrogenase.

ABSTRACT

Sickle cell anemia is a disorder of genetic hemoglobin more common around the world, characterized by the presence of abnormal hemoglobin S. The phenomena of vaso-occlusion and anemia characteristics cause tissue damage leading to organ damage, including the kidneys. The various types of renal abnormalities occur primarily in the renal medulla. Clinical manifestations of sickle cell nephropathy start early, often before one year of age with glomerular hyperfiltration, hyposthenuria, renal tubular acidosis distal and, over time, increase in albuminuria. The lactate dehydrogenase (LDH) is considered a useful marker of hemolysis and its levels are very high in the presence of intravascular hemolysis, as indicated by some authors as associated with various complications related to hemolysis, including renal complications. In order to identify laboratory variables associated with renal injury in patients with sickle cell anemia, a cross-sectional study was conducted in children, teenagers and young adults treated in the hematology ward of the HU-UFS, from October 2010 to June 2011. Laboratory tests were performed in 124 patients with sickle cell anemia, mean age 13.3 ± 6.4 years (2 - 32 years), 56.5 % were male. There was a frequency of microalbuminuria and proteinuria 19.4 % and 18.5% respectively. The frequency of glomerular hyperfiltration was 63.7 %. Elevation of LDH occurred in 95 % of patients and correlated positively with microalbuminuria, with percentages of reticulocytes and inversely with average rates of hemoglobin. Although univariate analysis revealed a significant positive correlation between the levels of LDH and microalbuminuria, these values were not significantly different between patients with or without microalbuminuria, suggesting that the association with renal injury is not specific, since it was also associated with markers of hemolysis. It is concluded that, levels of LDH present variability independently of microalbuminuria, because LDH levels were not able to distinguish patients with and without microalbuminuria.

Key-words: Albuminuria; lactate dehydrogenase; sickle cell anemia.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Alterações morfológicas em eritrócitos de pessoa com Anemia Falciforme, por microscopia eletrônica. O eritrócito não falcizado apresenta várias lesões morfológicas de membrana devido à falcizações e desfalcizações ao longo do seu período de vida (Fonte: Naoum, P.C, 2011).....22
- Figura 2** - Radiografia termográfica da mão de um paciente com Anemia Falciforme, mostrando a oclusão vascular nos dedos e a estagnação de sangue (Fonte: Naoum, P.C, 2011).....23
- Figura 3** - Sistema químico VITROS® 5,1 FS instalado no Setor de Bioquímica do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....38
- Figura 4** - Cell-Dyn RUBY (Abbott Diagnostics) instalado no Setor de Hematologia do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....42
- Figura 5** – Distribuição da frequência da microalbuminúria nos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe de acordo com a faixa etária.....46
- Figura 6** - Frequência da filtração glomerular em pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....49
- Figura 7** - Distribuição da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) entre os grupos etários de pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....49

Figura 8 - Distribuição dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe de acordo com taxa filtração glomerular (TFG) e a presença ou não de microalbuminúria (Malb) e proteinúria total (Prot. Total).....50

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva ROC mostrando a sensibilidade e a especificidade para discriminar microalbuminúria a partir dos diversos pontos de corte da desidrogenase láctica.....52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da amostra segundo dados demográficos e condições clínicas de pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....	44
Tabela 2 - Características laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe	45
Tabela 3 – Tabela 3- Proporção de pacientes com Anemia Falciforme com microalbuminúria de acordo com a idade atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe	46
Tabela 4 - Comparação entre variáveis demográficas e bioquímicas entre pacientes com Anemia Falciforme com e sem microalbuminúria e proteinúria atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....	48
Tabela 5 - Correlação entre os marcadores de lesão renal e as variáveis laboratoriais em pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....	51
Tabela 6 - Regressão linear múltipla ilustrando as variáveis associadas independentemente à desidrogenase láctica dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AST: Aspartato Transaminase

ALT: Alanina Transaminase

AVC: Acidente Vascular Cerebral

ClCr: Clearance de Creatinina

EDTA: Etilenodiaminotetracético

GGT: Gama Glutamyltranspeptidase

Hb: Hemoglobina

HbS: Hemoglobina S

HbF: Hemoglobina F

HbA: Hemoglobina A

HbSS: Pacientes homozigotos para HbS

HIV: Vírus da Imunodeficiência Humana

IgG: Imunoglobulina G

IRC: Insuficiência Renal Crônica

DHL: Dehidrogenase Láctica

OMS: Organização Mundial de Saúde

WHO: World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1 A anemia Falciforme.....	18
2.1.1 Fisiopatologia	18
2.1.2 Epidemiologia.....	19
2.1.3 Diagnóstico	21
2.1.4 Manifestações clínicas.....	21
2.1.4.1 Manifestações renais.....	24
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 Objetivo Geral	33
3.2 Objetivos específicos.....	33
4 MÉTODOS.....	34
4.1 Local e população de estudo.....	34
4.2 Desenho do estudo.....	34
4.3 Amostra populacional.....	34
4.4 Coleta de Dados.....	34
4.5 Critérios de inclusão e exclusão	36
4.5.1 Critérios de exclusão.....	36
4.6 Seleção de Pacientes.....	36
4.7 Variáveis laboratoriais.....	37
4.8 Considerações éticas.....	42
4.9 Análise estatística.....	43

5 RESULTADOS.	44
6 DISCUSSÃO.....	54
7 CONCLUSÃO.	61
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	62
9 REFERÊNCIAS.....	63
10 APÊNDICES.....	68
10.1 APÊNDICE A– Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
11 ANEXOS.....	70
11.1 ANEXO A– Aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da UFS.	71
11.2 ANEXO B – Nomograma para determinação da superfície corporal.....	72
12 PAPER.....	73

1 INTRODUÇÃO

A Anemia Falciforme é uma doença grave, que afeta milhões em todo o mundo e resulta de uma desordem de caráter genético da hemoglobina. Caracteriza-se pela substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina A, dando origem a hemoglobina anormal S (HbS) que, em condições de hipóxia, sofre polimerização dentro dos eritrócitos, conferindo aos mesmos uma forma alongada semelhante à de uma foice (LOPEZ e CAMPOS JUNIOR, 2010). Esta distorção dos eritrócitos leva a sua própria destruição precoce e obstrução de pequenos vasos, causando um amplo espectro de complicações clínicas que atingem a maioria dos órgãos e aparelhos, comprometendo, muitas vezes, a função de órgãos vitais e a qualidade de vida dos pacientes (GUASCH *et al*; KLIEGMAN *et al*, 2006; ZAGO *et al*, 2007).

Dados clínicos e patológicos indicam que a falcização intravascular ocorre mais facilmente nos rins do que em qualquer outro órgão. O primeiro sinal de lesão renal acontece ainda nos primeiros anos de vida com um defeito na concentração urinária, o que pode resultar em poliúria, enurese noturna e desidratação. Em alguns casos, a doença pode progredir para insuficiência renal crônica (IRC) e resultar em doença renal em estágio terminal (MARCONDES *et al*, 2004; PLATT *et al*, 1994). Com isto, há uma preocupação crescente com nefropatia associada à Anemia Falciforme e também um aumento crescente no interesse nos estágios iniciais e no reconhecimento da clínica associada aos fatores de risco para nefropatia. Os marcadores de lesão renal, mais estudados, são microalbuminúria, proteinúria e taxa

de filtração glomerular. Tanto a microalbuminúria como a proteinúria são bastante comuns nos pacientes com Anemia Falciforme e elevação de microalbuminúria é o primeiro sinal de lesão glomerular.

A hiper-hemólise está associada à diminuição da biodisponibilidade do óxido nítrico, o que favorece a vasoconstrição, o comprometimento da circulação sanguínea local e consequente dano ao respectivo órgão. A dehidrogenase láctica (DHL) é considerada um marcador útil de hemólise e seus níveis encontram-se bastante elevados na presença de hemólise intravascular. Como um terço da hemólise na Anemia Falciforme ocorre intravascularmente, estudos têm demonstrado que a DHL pode ser um marcador útil de complicações relacionadas à hemólise na doença falciforme, inclusive complicações renais (ATAGA *et al*, 2006; GURKAN, *et al*, 2010; KATO, *et al*, 2007).

É de fundamental importância a identificação precoce de pacientes que estão em risco de desenvolver nefropatia falciforme para que se possa introduzir a terapia mais precocemente, evitando, assim, a progressão para IRC e, consequentemente, para doença renal em estágio final. A identificação de novos biomarcadores contribui para o delineamento de fatores de risco e pode garantir um diagnóstico mais preciso e a DHL é uma enzima candidata a biomarcador de lesão renal em indivíduos portadores de Anemia Falciforme. Deste modo, se houver uma correlação entre os níveis séricos de DHL com os marcadores de lesão renal em pacientes com anemia falciforme, os médicos terão um indicador, simples e barato, para envolvimento renal nesses pacientes, para que se possa garantir a identificação precoce de pacientes de risco para insuficiência renal, a introdução da profilaxia e tratamento mais específico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A Anemia Falciforme

2.1.1 Fisiopatologia

A doença falciforme é a doença hematológica, de caráter genético, mais comum em todo o mundo e pode ser encontrada em todos os continentes. A doença caracteriza-se pela substituição do ácido glutâmico pela valina na posição seis da cadeia beta da hemoglobina A (HbA), o que resulta em herança de uma hemoglobina anormal, a hemoglobina S (MARCONDES, *et al*, 2004; ZAGO, *et al*, 2007).

A hemoglobina S tem uma característica química especial que, em condições de baixa saturação de oxigênio, hiperosmolalidade e acidose, sofre uma modificação na sua conformação molecular desencadeando a formação de feixes de polímeros dentro dos eritrócitos, aumentando sua viscosidade interna e conferindo aos mesmos uma forma alongada semelhante à de uma foice ou meia-lua, daí o nome falciforme (BARABINO *et al.*, 2010; KLIEGMAN; PINHEIRO *et al.*, 2006;). Ela pode se manifestar em indivíduos homozigóticos para hemoglobina S (HbSS) e em combinação com outras hemoglobinas anormais, como hemoglobina C (SC), beta-talassemia (S β) e hemoglobina D (SD) entre outras, o que pode resultar em doenças falciformes com diversos graus de gravidade (SERJEANT *et al.*, 2009). O termo anemia falciforme é reservado para a forma da doença que ocorre nos homozigotos, ou seja, pacientes com HbSS. (LOPEZ e CAMPOS JÚNIOR, 2010; ZAGO *et al*, 2007).

Geralmente, quanto mais hemoglobina S presente, mais grave é a doença. Todas as manifestações clínicas da doença falciforme são dependentes do grau de desoxigenação, da anemia, presença ou ausência de hemoglobina F (HbF) e, principalmente, da concentração intracelular de hemoglobina S nos eritrócitos, pois a alta concentração desta hemoglobina facilita a sua associação, condicionando assim o fenômeno da falcização (BATISTA e ANDRADE, 2005; ZAGO, *et al*, 2007). Portanto, a forma homozigota da doença falciforme (HbSS), ou seja, a Anemia Falciforme, tem um quadro clínico mais grave (LOPES e CAMPOS JÚNIOR, 2010; ZAGO *et al*, 2007). A associação entre quantidade de hemoglobina S e gravidade da doença se explica pela facilidade desta hemoglobina de precipitar-se, quando ocorre desoxigenação. Esse fenômeno não acontece com os outros tipos de hemoglobina, cujas presenças podem inibir o fenômeno da falcização, como ocorre com a hemoglobina A e a hemoglobina F. Esta última exerce um efeito inibidor sobre a polimerização das globinas beta S, evitando a falcização (BATISTA e ANDRADE, 2005). Com isto, os recém-nascidos, por apresentarem alta porcentagem de hemoglobina F, só começam a manifestar a doença a partir do quarto ao sexto mês de idade, período em que ocorre uma gradual substituição desta hemoglobina por hemoglobina S e seus níveis aproximam-se dos níveis do adulto (VICKINSKI, *et al*, 1988).

2.1.2 Epidemiologia

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2011), a Anemia Falciforme afeta milhões de pessoas em todo o mundo e é particularmente comum entre aquelas cujos ancestrais vêm da África Subsaariana, América do Sul, Cuba,

América Central, Arábia Saudita, Índia e países do Mediterrâneo como a Turquia, Grécia e Itália. A doença foi trazida à América através do comércio de escravos e é mais frequente, portanto, onde ocorre maior concentração de população de origem negra.

Nos EUA, a Anemia Falciforme ocorre em um a cada 400 nascimentos na população de origem africana e um a cada 1000 a 1400 nascimentos de crianças de origem hispânica (GUASCH *et al*, 2006; WHO, 2011). Nesse país, cerca de uma a cada 12 pessoas de origem africana carregam o alelo da Anemia Falciforme (WHO, 2011).

No Brasil, a Anemia Falciforme é, provavelmente, a comorbidade genética mais prevalente. Estima-se o nascimento de uma criança, com Anemia Falciforme, a cada mil nascidos vivos (CANÇADO e JESUS, 2007; RAMALHO *et al*, 2003). Devido à grande miscigenação racial, a doença distribuiu-se heterogeneamente no país, sendo encontrada em todas as regiões e apontada pela literatura científica brasileira como um problema grave de saúde pública (CANÇADO e JESUS, 2007; PINHEIRO *et al.*, 2006). Segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2002), a prevalência de heterozigotos para hemoglobina S, no Brasil, é de 2 % a 6 % nas diversas regiões do país, aumentando para 6 % a 10 % na população negra. Na região Nordeste a prevalência é de 4 a 6 %. Em Sergipe, recentemente, um estudo realizado por Ferreira (2009), em puérperas nas maternidades de Aracaju, mostrou uma prevalência de 4,0 % de puérperas e 4,5 % de recém-nascidos portadores de hemoglobina S.

2.1.3 Diagnóstico

O diagnóstico definitivo da Anemia Falciforme é feito através da eletroforese de hemoglobina. Pela eletroforese, as cadeias β globínicas podem ser detectadas ainda na fase fetal, a partir da 10^a a 12^a semana de vida intrauterina, o que possibilita o diagnóstico da doença ainda na fase pré-natal (BECTON *et al*, 2010; KOREN *et al*; SERJEANT *et al.*, 2009; WESSON, 2002). Entretanto, muitas vezes o diagnóstico tem início ao se realizar alguns exames laboratoriais como o hemograma, por exemplo, que revela a hemoglobina com valores abaixo da faixa de normalidade, presença de drepanócitos e eritroblastos (eritrócitos jovens) na extensão sanguínea, além da contagem de reticulócitos elevada, característica comum nas hemólises (OLIVEIRA e NETO, 2004).

2.1.4 Manifestações clínicas

A polimerização da hemoglobina S nos eritrócitos provoca múltiplas alterações dentro da célula, entre elas a perda de potássio, acúmulo de cálcio intracelular e da membrana e alteração nas proteínas da membrana com formação de polímeros com as mesmas (ZAGO *et al*, 2007). Assim, os eritrócitos perdem o poder de se deformar, em decorrência do enrijecimento da sua membrana, o que lhe impede de transpor o menor diâmetro dos capilares da microcirculação, resultando em diminuição de sua sobrevivência. Estes fatores, associados a uma maior capacidade do eritrócito falcizado de se aderir ao endotélio, favorecem a instalação de fenômenos inflamatórios locais e obstruções vasculares pela formação de trombos na micro e macrocirculação por essas células (GUASCH *et al*, 2006; MARCONDES *et al*, 2004; ZAGO *et al*, 2007). Portanto, a Anemia Falciforme é uma doença com quadro

de anemia hemolítica grave, com consequente aumento de bilirrubina indireta, elevação do número de reticulócitos na circulação periférica e hiperplasia da linhagem eritróide da medula óssea (ZAGO *et al*, 2007).

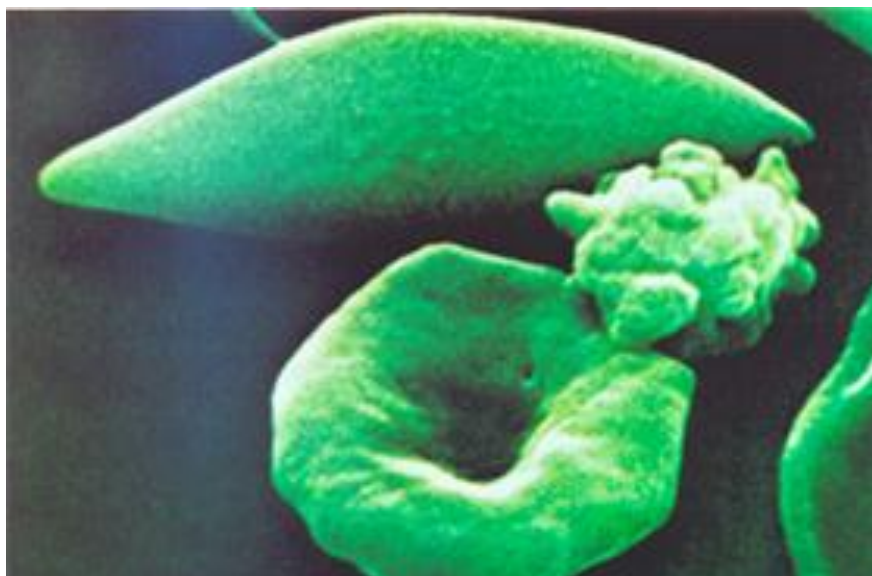


Figura 1: Alterações morfológicas em eritrócitos de pessoa com Anemia Falciforme, por microscopia eletrônica. O eritrócito não falcizado apresenta várias lesões morfológicas de membrana devido à falcizações e desfalcizações ao longo do seu período de vida (Fonte: Naoum, P.C, 2011).

A ocorrência de eventos repetitivos de vaso-oclusão e anemia crônica causam dor e lesão progressiva de múltiplos órgãos como coração, cérebro, fígado, esqueleto, olhos, pulmões, pele e rins (GUASCH *et al*; KLIEGMAN *et al*, 2006). Estes eventos, que ocorrem principalmente em pequenos vasos, constituem a fisiopatologia determinante na instalação da maioria dos sinais e sintomas do quadro clínico dos pacientes com Anemia Falciforme, que é caracterizado por crises hemolíticas, necrose avascular da medula óssea (crises álgicas/síndrome mão-pé/necrose da cabeça do fêmur), filtração esplênica alterada, fibrose esplênica progressiva, osteomielite, síndrome torácica aguda, vasculopatia cutânea (úlceras crônicas),

priapismo (estado de ereção dolorosa do pênis causada pela obstrução dos vasos penianos), retinopatias proliferativas, acidente vascular cerebral (AVC), acometimento renal (tubulopatia/insuficiência renal crônica), sequestro de glóbulos vermelhos (agudo ou crônico), anemia (Hb entre 6 e 9 g/100 ml), hiperbilirrubinemia, icterícia, expansão da medula óssea, crise de aplasia induzida pelo parvovírus humano B19 (BALLAS *et al.*, 2009; KLIEGMAN *et al.*, 2006; GALIZA NETO e PITOMBEIRA, 2003; ZAGO *et al.*, 2007). Estes pacientes também têm retardo na maturação sexual além de altura, peso e índice de massa corporal diminuídos. (BALLAS *et al.*, 2009; CIPOLOTTI *et al.*, 2000; GUASCH *et al.*, 2006).

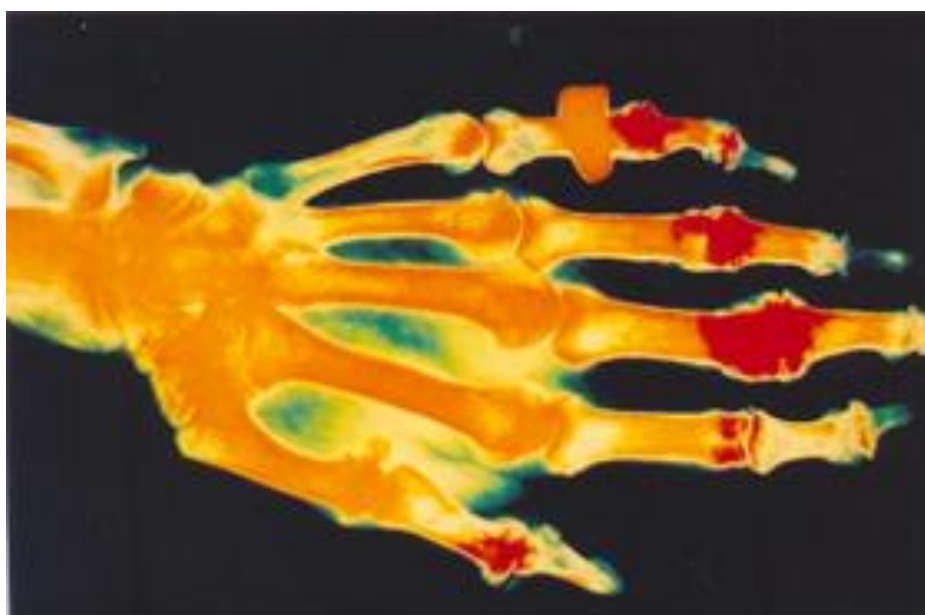


Figura 2- Radiografia termográfica da mão de um paciente com Anemia Falciforme, mostrando a oclusão vascular nos dedos e a estagnação de sangue (Fonte: Naoum, P.C, 2011).

Nos últimos anos, com a melhoria na qualidade do atendimento aos pacientes com Anemia Falciforme, ocorreu uma redução da taxa de mortalidade e maior sobrevida (CANÇADO, 2007). Num estudo multicêntrico realizado em 1994 por Platt *et al* nos E.U.A, envolvendo mais de três mil pacientes com a doença, a média

de idade de morte na década de 90 foi de 42 e 48 anos para homens e mulheres, respectivamente. Em outro estudo de coorte realizado na Jamaica, revelou que a prevalência de idade, ao morrer, era de 53 anos em homens e 58,5 anos em mulheres (WIERENGA, 2001). No Brasil, Loureiro e Rozenfeld (2005) realizaram um estudo das internações por Anemia Falciforme ocorridas nos estados de São Paulo, Bahia e Rio de Janeiro durante os anos de 2000 a 2002 e observaram uma média de idade para óbitos de 30,0 anos. Embora bem superior aos 14,3 anos de três décadas atrás, esta ainda se encontra muito aquém da expectativa de vida para a população geral, o que evidencia a gravidade da doença e a necessidade de maiores investimentos e progressos no tratamento desses pacientes (HASSELL; PRABHAKAR *et al*; QUINN *et al*, 2010).

2.1.4.1 Manifestações renais

Algumas das complicações da Anemia Falciforme não afetam diretamente a expectativa de vida, apesar de comprometer a qualidade de vida. Porém outras comprometem a função de órgãos vitais, como a insuficiência cardíaca congestiva, síndrome torácica aguda, AVC e insuficiência renal, complicações que estão associadas diretamente ao risco da vida (ZAGO *et al*, 2007). No estudo realizado por Platt *et al* (1994), 18 % dos pacientes adultos tiveram mortes por insuficiência de órgãos, principalmente insuficiência renal. Portanto, com o aumento da sobrevida dos pacientes com Anemia Falciforme houve, infelizmente, um aumento nas complicações em longo prazo, como a incidência de nefropatia e outras lesões renais que, frequentemente, levam à IRC e poderá culminar com estágio final da doença renal (POWARS *et al*, 1991; WESSON, 2002).

Os rins, em decorrência de ser uma região onde os eritrócitos se encontram sujeitos à desidratação e a baixos níveis de oxigênio, constituem um local com propensão para ocorrência de crises de vaso-obstrução. Assim, dados clínicos e patológicos indicam que a falcização das hemácias ocorre mais frequentemente nos rins do que em qualquer outro órgão e estudos têm revelado que a insuficiência renal ocorre mais frequentemente em pacientes com Anemia Falciforme do que na população sem a doença (POWARS *et al*, 1991; WESSON, 2002). Frequentemente, indivíduos com esta doença apresentam anormalidades renais estruturais glomerulares, medulares e alterações funcionais (MARCONDES, 2004). Com isto, há uma preocupação crescente com nefropatia associada à Anemia Falciforme, devido à possível evolução para IRC e doença renal em estágio final, onde se faz necessária diálise e transplante de rins.

As alterações renais são mais frequentes na medula renal e, segundo Marcondes *et al* (2004), isso ocorre porque a medula é uma região dotada de acidose, hipóxia e hipertonicidade, enfim, todas as condições que propiciam a falcização dos eritrócitos na vasa recta. Estas alterações resultam de danos vasculares, onde há formação de micro trombos, com comprometimento do fluxo sanguíneo, causando micro infartos e levando, conseqüentemente, à isquemia local. De acordo com esses autores, o afoiçamento das hemácias desencadeia um ciclo vicioso, com aumento da viscosidade sanguínea, trombose, retardo do fluxo sanguíneo, estase e hemólise. Esses fenômenos levam a hipóxia que é, por sua vez, responsável pela manutenção do transtorno falcêmico.

Provavelmente devido à anemia crônica, fluxo sanguíneo renal aumentado e eventos de vaso-oclusão intraparenquimatoso, nos pacientes com Anemia Falciforme, a doença renal inicia-se ainda na infância e progride até a idade adulta (MAGALHÃES, 2007). A destruição da medula renal, com consequente redução do número de vasa recta e perda da arquitetura normal, levam a um defeito na concentração urinária (hipostenúria), que começa numa idade precoce, muitas vezes antes de um ano de idade, sendo o primeiro sinal e a característica mais consistente de nefropatia na anemia falciforme (AYGUN, *et al*, 2011). Na criança a hipostenúria pode resultar em enurese noturna, poliúria e a um maior risco de desidratação, com consequente perda de sódio quando privado de água. A desidratação, por sua vez também é um fator que apresenta o potencial de desencadear eventos vaso-oclusivos, criando um ciclo de amplificação da patologia, no caso de não se tomar os cuidados necessários para manter o nível de hidratação (BECKER, 2011; MARCONDES *et al* 2004; SESSO *et al* 1998). Outras manifestações precoces de nefropatia falciforme são hiperfiltração glomerular e acidose tubular renal distal com o desenvolvimento de albuminúria e hematúria ocasional, que envolve mais frequentemente o rim esquerdo devido aos micro infartos e sendo associada à necrose papilar (AYGUN, 2011; NIANG, 2004).

Dentre as alterações glomerulares estão, principalmente, a dilatação dos glomérulos com hiper celularidade e lobulação dos tufo s glomerulares, podendo ocorrer também duplicação da membrana basal (NHLBI, 2002). Para Wesson, (2002) a repetição de eventos vaso-oclusivos na medula renal pode levar a uma lesão caracterizada por hipertrofia glomerular precoce seguida de glomeruloesclerose segmentar focal eventual. Platt *et al* (1994) e Wesson (2002) afirmam que o

desenvolvimento de glomeruloesclerose segmentar focal ou glomerulonefrite membranoproliferativa, hiperfiltração, albuminúria e, ainda, a deposição de ferro podem contribuir para a filtração glomerular diminuída com o avanço da idade e resultar, muitas vezes, em doença renal em estágio terminal que afeta muitos jovens adultos. Powars *et al* (2005) afirmam que 4 a 18 % dos pacientes com Anemia Falciforme irão desenvolver estágio final de doença renal. De acordo com esses autores, a sobrevida média desses pacientes é de quatro anos e 40 % irão a óbito após 20 meses a partir da diálise. Esses mesmos autores, em 1991, numa coorte de 25 anos observaram uma idade média de 23,1 anos para o aparecimento da insuficiência renal na Anemia Falciforme. Assim, aumenta o interesse pelos estágios iniciais do envolvimento renal e o reconhecimento da clínica associada aos fatores de risco para nefropatia, pois esta, embora despercebida na fase inicial, é uma característica muito frequente entre as muitas complicações crônicas que acomete estes pacientes (HAYMANN, *et al*, 2010).

Diversos marcadores têm sido estudados para a indicação de envolvimento renal, entre eles a creatinina, microalbuminúria, proteinúria e clearance de creatinina (LEVEY *et al*, 2003). A creatinina não é um marcador muito sensível, pois seus níveis séricos podem ser afetados por vários fatores como massa muscular, taxa de filtração glomerular e alguns medicamentos que interferem na técnica utilizada na dosagem. Além disso, quando os níveis de creatinina sérica se elevam, já existe um comprometimento renal estabelecido (MAGRO e VATTIMO, 2007).

A microalbuminúria e a proteinúria são achados comuns em pacientes com anemia falciforme, sendo manifestações precoces de nefropatia. A proteinúria

começa como microalbuminúria, que é um biomarcador de triagem simples e sensível de lesão renal, sendo o primeiro marcador a se apresentar alterado na presença de lesão glomerular podendo progredir para macroalbuminúria (proteinúria) quando o rim apresenta danos maiores resultantes da doença falciforme (AYGUN *et al* 2011; BECKER, 2011). Para Wesson (2002), 20 a 30 % dos pacientes com Anemia Falciforme apresentarão proteinúria, o que é um prenúncio de doença renal crônica. Portanto, a detecção precoce de proteinúria é importante para monitoramento destes pacientes, pois o início da intervenção terapêutica nesta fase pode prevenir ou pelo menos retardar os danos renais.

Estudos têm mostrado pacientes com Anemia Falciforme apresentando microalbuminúria em idade precoce e sua frequência sendo relacionada com idade. Num estudo envolvendo 102 crianças com Anemia Falciforme (idade de dois a 18 anos), em Michigan (EUA), Dharnidharka *et al* (1998) observaram 26,5 % de pacientes, a partir de sete anos de idade, com microalbuminúria. Quando separados por faixa etária, esses autores observaram uma frequência de 46 % de microalbuminúria em pacientes entre 10 e 18 anos de idade. Datta *et al* (2003) em um estudo realizado em pacientes com Hb SS e idade até 14 anos, em Wardha (Índia), encontraram uma frequência de 19,2 % de microalbuminúria. Destes, 14,3 % eram pacientes com menos de nove anos de idade e 33,3% estavam na faixa etária de 9 a 14 anos.

Marsenic *et al* (2008), em um estudo realizado também em pacientes homozigotos, na faixa etária de oito meses e 19 anos na Filadélfia (EUA), além de encontrar microalbuminúria em idade mais precoce (quatro anos de idade) notaram

que 46 % dos pacientes apresentaram aumento de excreção de proteinúria total sem aumento de qualquer uma das proteínas testadas, ou seja, albumina, IgG e proteína carreadora de retinol, sugerindo que nesses pacientes devem ser testados tanto a microalbuminúria quanto a proteinúria para a detecção de dano renal.

Van Beers *et al*, (2008) e também Marsenic (2008) mostraram que a frequência de microalbuminúria ocorre independente dos indicadores de gravidade da doença, como o número e frequência de crises de dor, história de AVC, sequestro esplênico e transfusão crônica o que pode, por vezes, passar despercebida e defendem a avaliação rotineira dos danos causados nos órgãos de pacientes com anemia falciforme a fim de evitar o atraso na introdução de medidas terapêuticas.

A taxa de filtração glomerular avalia a função renal e, segundo Wigfall, *et al* (2000) e Becker (2011) a lesão isquêmica na medula renal pode liberar substâncias vasodilatadoras, como prostaglandinas e NO, causando um aumento da taxa de filtração glomerular. A hiperfiltração glomerular, quando prolongada, pode resultar em lesão renal levando ao desenvolvimento de proteinúria (WIGFALL *et al* 2000). Thompson (2007), num estudo de coorte realizado em pacientes jamaicanos com Anemia Falciforme, verificou que, ao contrário do esperado, microalbuminúria estava associada com hiperfiltração glomerular, aumentando a possibilidade de que taxas elevadas de filtração glomerular podem contribuir para a lesão renal.

Hiperfiltração glomerular tem sido observada em crianças doença falciforme a partir de 12 meses de idade sendo associada com a idade e apresentando aumento da frequência até a segunda década de vida. A partir daí a frequência de hiperfiltração começa a diminuir e aumenta a frequência de taxas de filtração

glomerular diminuída (WIGFALL *et al*, 2000). No entanto, Haymann *et al* (2010), ao estudar somente pacientes adultos com Anemia Falciforme, mostraram hiperfiltração glomerular em 52% de pacientes com microalbuminúria e 40 % com macroalbuminúria nesta população e uma forte correlação de hiperfiltração com biomarcadores de hemólise como baixas taxas de hemoglobina, valores elevados de bilirrubina e baixas taxas de hemoglobina F.

É proposto que a hiper-hemólise representa um novo sub-fenótipo da Anemia Falciforme, sendo associada com mortalidade prematura em adultos com esta doença. Na anemia falciforme, a hemólise varia entre os pacientes e sua intensidade é modulada pela presença de hemoglobina F (TAYLOR *et al.*, 2008). A hiper-hemólise é normalmente diagnosticada quando o aumento da anemia ocorre sem a presença de outras causas identificáveis de destruição de glóbulos vermelhos como, por exemplo, o sequestro esplênico ou hepático, sendo frequentemente acompanhada por aumento de reticulócitos e/ou de eritroblastos no sangue periférico (BALLAS *et al*, 2009).

O dano do órgão relacionado à hemólise é possivelmente aumentado pela diminuição de óxido nítrico, substância vasodilatadora que regula o tônus da musculatura lisa vascular (O'DRISCOLL *et al*, 2008; ROTHER *et al*, 2005; STUART e NAGEL, 2004). Durante a hemólise ocorre liberação de hemoglobina e arginase no plasma. A hemoglobina livre se liga ao óxido nítrico e a arginase esgota a arginina que é o substrato usado para a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase. Consequentemente, ocorre uma diminuição da sua biodisponibilidade (GLADWIN, 2004), favorecendo a vasoconstrição e

comprometendo, assim, a fisiologia da circulação sanguínea local com consequente dano ao respectivo órgão (KATO *et al*, 2007; MINNECI *et al*, 2008; REITER *et al*, 2002; ROTHER *et al*, 2005;).

A enzima DHL é considerada um marcador útil de hemólise e seus níveis encontram-se elevados na presença de hemólise intravascular. Essa enzima está presente no citoplasma de todas as células do organismo, sendo rica nos tecidos cardíaco, hepático, pulmonar e renal, além do músculo esquelético e eritrócitos (MOTA, 2009). Níveis elevados de DHL, presentes em pacientes com Anemia Falciforme, têm atraído a atenção de vários pesquisadores. Acredita-se que sua elevação identifica pacientes com Anemia Falciforme com uma síndrome de hemólise associada à resistência à vasodilatação dependente de óxido nítrico, disfunção endotelial e vasculopatia em vários órgãos (KATO *et al*, 2007). Na Anemia Falciforme, um terço da hemólise ocorre intravascularmente, liberando hemoglobina livre no plasma. Como na prática rotineira, é difícil avaliar óxido nítrico e hemoglobina livre no plasma, a importância da dosagem de DHL tem aumentado e vem surgindo como um marcador útil de complicações relacionadas à hemólise na doença falciforme (KATO *et al*, 2007). Alguns estudos, neste sentido, têm correlacionado os níveis de DHL com úlceras de perna, priapismo, hipertensão pulmonar e morte precoce (ATAGA *et al*, KATO *et al*, 2006; GLADWIN *et al*, 2004). Recentemente, Taylor *et al*, (2008) e O' Driscoll *et al*, (2008) encontraram correlação de DHL como sendo preditiva de maior risco de AVC.

Um estudo realizado por Kato *et al* (2006), envolvendo 213 pacientes com doenças falciformes, mostrou que os valores das isoenzimas LD1 e LD2 de DHL

estavam acima da faixa de normalidade nesses pacientes. Essas isoenzimas são mais dominantes nos eritrócitos, coração e rim. Por outro lado esses autores observaram também que as isoenzimas LD3, dominantes nas células linfóides e plaquetas; LD4 e LD5, dominantes no músculo esquelético e fígado, estavam com níveis abaixo da faixa de normalidade nestes pacientes, sugerindo que as fontes de DHL, nos pacientes com doença falciforme, seriam os eritrócitos, o músculo cardíaco e o tecido renal. Outro achado desses autores é que, apesar do músculo cardíaco ser também uma fonte de LD1 e LD2, não houve correlação dos valores destas isoenzimas com marcadores clínicos para lesão cardíaca. Em relação ao tecido renal, Kato *et al* (2006) correlacionaram valores dessas isoenzimas com a creatinina, mas esta variável não se apresenta como um bom sinalizador de envolvimento renal, pois apesar de ser específica para o comprometimento renal, diversos fatores podem influenciar os níveis de creatinina como a massa muscular e a taxa de filtração glomerular (LEVEY *et al*, 2003; MAGRO e VATTIMO, 2007). Como os pacientes com Anemia Falciforme possuem peso, altura e índice de massa corporal mais baixos do que a população em geral (CIPOLOTTI *et al*, 2000; GUASCH, *et al*, 2006) e muitos apresentam também elevada taxa de filtração glomerular, a creatinina sérica apresenta valores abaixo do esperado e adicionalmente reduzida pela hipersecreção de creatinina pelos túbulos renais (LEVEY *et al*, 2003). Estima-se que metade dos pacientes com filtração glomerular diminuída, apresentam valores de creatinina sérica normal, o que torna esta variável pouco precisa, tardia e pouco sensível como sinalizador de lesão renal (GUASCH *et al*, 2006; PECOITS-FILHO, 2004).

Estudos recentes realizados por Gurkan *et al* (2010) em 40 pacientes com doença falciforme (sendo 81 % com HbSS) atendidos durante um ano no Hospital

Bristol-Myers Squibb (EUA), mostraram correlação entre os níveis de DHL e microalbuminúria e entre níveis de DHL e proteinúria, quando feito análise univariada de todos os pacientes com a doença (heterozigotos e homozigotos). Esses autores verificaram também que os níveis de DHL encontravam-se significativamente diferentes quando os pacientes eram separados por grupo quanto à presença de microalbuminúria e essa diferença foi significativamente maior quando a análise considerou apenas os pacientes portadores de HbSS com microalbuminúria.

Gurkan *et al* (2010) sugerem a importância de um estudo mais aprofundado, abrangendo um número maior de pacientes, sobre o envolvimento da DHL com lesão renal na doença falciforme e que, talvez, esse indicador laboratorial simples e barato, possa ser utilizado como um indicador de dano renal nesses pacientes. Consequentemente, poderá favorecer a indicação de uma terapia mais precoce no tratamento de insuficiência renal em pacientes com Anemia Falciforme, prevenindo a evolução desfavorável para essa população.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Identificar variáveis laboratoriais associadas à lesão renal em portadores de Anemia Falciforme.

3.2 Específicos

- Determinar a frequência de microalbuminúria e proteinúria nos pacientes portadores de Anemia Falciforme.
- Correlacionar os níveis séricos de desidrogenase láctica com microalbuminúria, proteinúria e clearance de creatinina em portadores de Anemia Falciforme.

4 MÉTODOS

4.1 Local e população de estudo

A pesquisa envolveu todos os pacientes com Anemia Falciforme que compareceram ao Ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe para consultas de rotina, no período de outubro de 2010 a junho de 2011. Este ambulatório é o serviço de referência para hemoglobinopatias no estado de Sergipe e atende também pacientes procedentes de municípios vizinhos.

4.2 Desenho do estudo

Foi utilizado um modelo de estudo transversal e analítico

4.3 Amostra populacional

Foram selecionados para o estudo todos os pacientes homozigotos para hemoglobina S com diagnóstico confirmado por eletroforese de hemoglobina.

4.4 Coleta de dados

Os prontuários dos pacientes foram revisados para obtenção de dados como eletroforese de hemoglobina, progressão da doença, história de esplenectomia e infecções, acidente vascular cerebral (AVC) e terapia com Hidroxiuréia.

4.5 Critérios de inclusão e exclusão

4.5.1 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo:

- Pacientes que, no momento da realização dos exames ou até quatro dias anteriores ao exame, estavam com crises dolorosas ou crises vaso-oclusivas.
- Pacientes heterozigotos para a hemoglobina S.
- Pacientes portadores de qualquer condição sistêmica que pudesse resultar em glomerulopatia não relatada para Anemia Falciforme, como hepatites, lúpus, artropatias inflamatórias ou infecção por vírus da imunodeficiência humana (HIV).

4.6 Seleção de Pacientes

A amostra foi não aleatória (por conveniência), realizada de forma consecutiva. O estudo envolveu 134 pacientes que, após consulta de rotina foram encaminhados ao laboratório do Hospital Universitário para exames. Atendendo aos critérios de inclusão e exclusão, foram excluídos 10 pacientes: um por ser heterozigoto para hemoglobina S, um por ser portador de hepatopatia, um por apresentar alterações nas dosagens das enzimas cardíacas e sete por não conseguirem colher a urina de 24 horas adequadamente.

4.7 Variáveis laboratoriais

Os exames laboratoriais incluíram: dosagens séricas de ureia, creatinina, DHL, bilirrubinas totais e frações, hemograma completo, contagem de reticulócitos, verificação dos elementos anormais e sedimentoscopia na urina (EAS), microalbuminúria, proteinúria total, clearance de creatinina (ClCr) e, quando necessário a confirmação do tipo de hemoglobinopatia, eletroforese de hemoglobina. Para afastar a hipótese de aumento de DHL por problemas hepáticos ou cardíacos, foram realizadas, também, dosagens de aspartato-transaminase (AST) e alanina-transaminase (ALT), gamaglutamiltransferase (GGT) e fosfatase alcalina, creatinokinase (CK), creatinokinase fração mb (CKMB).

As dosagens bioquímicas, tanto séricas quanto urinárias, foram realizadas pela metodologia da química seca no Sistema Vitros 5.1 FS (*Ortho Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson Company*) (Figura 3). Esta plataforma utiliza os seguintes tipos de testes para os respectivos parâmetros:

- ALT, CKMB e DHL: cinética de pontos múltiplos;
- Ureia, Bilirrubina total e Proteinúria total: colorimétrico;
- Bilirrubina não conjugada: colorimétrico de ponto final (duplo comprimento de onda);
- GGT, Fosfatase alcalina, AST e CK total: taxa de pontos múltiplos;
- Creatinina: cinético de dois pontos;
- Microalbuminúria: ponto final em branco.



Figura 3: Sistema Químico VITROS® 5,1 FS instalado no Setor de Bioquímica do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Para as dosagens séricas foi coletada uma amostra de 4 mL de sangue em tubo contendo gel separador, sem anticoagulante. Após coagulação do sangue, o tubo foi centrifugado durante 8 minutos em 2500 rpm para a separação do soro.

Segundo as especificações do Sistema Químico Vitros 5.1, os valores de referência utilizados para as variáveis dosadas foram:

- Ureia: 15 a 43 mg/dL
- Creatinina: 0,5 a 1,25 mg/dL
- GGT: Masculino: 15 a 73 U/L
Feminino: 12 a 43 U/L
- Fosfatase alcalina: 38 a 126 U/L
- AST: 14 a 59 U/L

- ALT: 09 a 72 U/L
- DHL: 313 a 618 U/L
- Bilirrubina Total: 0,2 a 1,3 mg/dL
- Bilirrubina Não Conjugada: 0,0 a 1,1 mg/dL
- Bilirrubina Conjugada: 0,0 a 0,3 mg/dL
- CK total: 30 A 170 UI/L
- CK-MB: 0 A 15 UI/L

Todos estes valores de referência foram obtidos através de estudos internos realizados pela empresa envolvendo cada uma das variáveis, validados para o Sistema Vitros 5.1.

As dosagens de microalbuminúria, proteinúria e creatinina urinária foram realizadas utilizando urina de 24h. Os pacientes foram instruídos quanto ao modo correto para coleta da urina de 24h em sua residência e trazê-la ao laboratório no final do procedimento. Antes de serem processadas, as urinas eram medidas e o volume total anotado. Após centrifugação de uma alíquota, a mesma era colocada no Sistema Vitros 5.1 para as respectivas dosagens. O termo proteinúria refere-se à excreção urinária aumentada de albumina ou qualquer outra proteína. Microalbuminúria refere-se à apenas à excreção de albumina que excede à faixa normal e que está abaixo do valor mínimo detectável nos testes para proteína total (LEVEY *et al*, 2003). De acordo com recomendações da *American Diabetes Association* considerou-se como normoalbuminúria valores menores ou iguais a 30 mg/24h; microalbuminúria valores superiores a 30 mg/24h e inferiores a 300 mg/24h e macroalbuminúria ou albuminúria clínica, valores iguais ou superiores a 300

mg/24h. Na dosagem de proteinúria total foi considerado os valores de referência do Sistema Vitros 5.1 de 42 a 225 mg/24h.

No laboratório, antes da coleta do sangue, todos os pacientes foram pesados e medidos para o cálculo da superfície corporal que foi obtida utilizando-se um nomograma que cruza valores do peso em kg e altura em cm do paciente (Anexo B). As determinações da filtração glomerular foram realizadas utilizando-se a fórmula da depuração da creatinina endógena na urina de 24h, cujas variáveis são: creatinina sérica, creatinina urinária e volume urinário. O resultado foi ajustado para a superfície corporal do paciente.

Fórmula para cálculo da ClCr:

$$\text{CrCl} = \frac{\text{Cr Urin}}{\text{Cr Sér.}} \times \text{VM} \times \frac{1,73}{S}$$

Onde: CrCl= Clearance de Creatinina

Cr Urin= Creatinina urinária em mg/dL

Cr Sér= Creatinina sérica em mg/dL

VM= Volume urinário por minuto

S= Superfície corporal do paciente

De acordo com *National Kidney Foundation*, foram considerados como valores de referência para o ClCr:

Mulheres: 88 a 128 mL/min/1,73m²

Homens: 97 a 137 mL/min/1,73m²

Crianças: 70 a 140 mL/min/1,73 m²

Os pacientes foram instruídos também a separar, em um frasco coletor próprio, uma amostra da primeira urina da manhã do exame para a realização do EAS. No laboratório essas amostras foram analisadas quanto à presença de elementos anormais como proteínas, substâncias redutoras, corpos cetônicos, hemoglobina, bilirrubinas, leucócitos, pH e densidade urinária através de tiras reativas. Logo após, uma alíquota de 10 mL foi centrifugada a 3500 rpm por cinco minutos, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento analisado, depositando-se uma gota bem homogeneizada sobre uma lâmina de microscopia e cobrindo com lamínula para a verificação da presença ou não de leucócitos e eritrócitos. Definiu-se como hematúria a presença de cinco ou mais eritrócitos por campo, numa média de dez campos examinados em um aumento de 400x (BASTOS *et al*, 1998) e, como leucocitúria, a presença de dez leucócitos ou mais por campo, numa média também de dez campos examinados em um aumento de 400x (SBN, 2012).

Para a realização do hemograma, contagem de reticulócitos e eletroforese de hemoglobina foram coletados 4 mL de sangue em tubo contendo anticoagulante EDTA. O hemograma foi realizado no contador de células, totalmente automatizado, Cell-Dyn Ruby -*Abbott Diagnostics* (Figura 4). Para contagem de reticulócitos, colocou-se uma gota do corante azul de cresil brilhante em uma gota de sangue e incubado a 37°C por 20 min. Após a incubação fez-se um esfregaço com 10 µL da mistura e, após secagem, realizou-se a contagem de reticulócitos em dez campos, comparando-os com o número de eritrócitos. Considerou-se como valores de referência a percentagem de reticulócitos entre 0,5 a 1,5 %.



Figura 4: Cell-Dyn RUBY (Abbott Diagnostics) instalado no Setor de Hematologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe

O diagnóstico de Anemia Falciforme foi baseado na eletroforese de hemoglobina realizada após a primeira consulta e constava nos prontuários dos pacientes. Nos casos de dúvidas ou ausência desta informação, novo exame era realizado para confirmação. A técnica consiste na focalização isoeletrica em gel de agarose, realizado no aparelho da *General Electric: Electrophoresis Power supply – EPS 3501 XL*, cuba eletroforética *Multiphor II*, scaneado pelo *Scan Marker i900 Microtek – Perkin Elmer*.

4.8 Considerações éticas

O projeto da pesquisa foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa com seres humanos da UFS e aprovado em 05 de outubro de 2010, sob o

número CAAE – 4915.0.000.107-10 (Anexo A). Todos os pacientes ou seus responsáveis foram esclarecidos quanto à meta e a natureza da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de acordo com a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996/CONEP (Apêndice A).

4.9 Análise estatística

Os dados foram coletados em formulário próprio e o banco de dados inseridos no Excel. As variáveis numéricas foram descritas como média e desvio padrão (DP) ou mediana, incluindo mínima e máxima, para resumir os dados. Análise exploratória dos dados foi realizada para investigar a distribuição e a relação entre as variáveis.

Foram utilizados os testes qui quadrado para correlação entre variáveis categóricas, teste t de Student para comparação entre dois grupos e correlação de Pearson. A análise de regressão linear múltipla, com seleção de variáveis pelo método "stepwise" por um lado e backward por outro, foi utilizada para obter um modelo parcimonioso que permitisse avaliar a correlação entre DHL e as variáveis independentes. Analisaram-se os pressupostos do modelo, nomeadamente o da distribuição normal, homogeneidade e independência dos erros além de diagnóstico de multicolinearidade. Considerou-se o intervalo de confiança de 95% para aceitação de diferenças nos testes estatísticos e uma probabilidade de erro tipo I ($\alpha=0,05$).

Todas as análises foram efetuadas com o SPSS (v. 17; SPSS inc. Chicago).

5 RESULTADOS

A amostra consistiu de 124 pacientes com Hb SS, com idade mínima de dois e máxima de 32 anos, sendo a maioria do sexo masculino. Observou-se que a maior parte dos pacientes submeteu-se à colecistectomia, tiveram AVC, úlceras de membros inferiores e necrose asséptica. A hematúria foi pouco comum, estando presente em 4,8 % e foi observada que 17,7 % dos pacientes estavam em terapia com hidroxiuréia (Tabela 1).

Tabela 1- Caracterização da amostra segundo dados demográficos e condições clínicas de pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

VARIÁVEIS	N	(%)
Idade (anos)	13,3 ± 6,4	
Sexo M	70	56,5
F	54	43,5
Complicações/medicação:		
Necrose asséptica	09	7,2
Úlceras de MI	10	8,0
AVC	14	11,2
Esplenectomia	10	8,0
Colecistectomia	26	21,0
Cálculos de vias biliares	07	5,6
Hematúria	06	4,8
Uso de hidroxiuréia	22	17,7

MI: Membros inferiores; AVC: Acidente Vascular Cerebral

As características laboratoriais são mostradas na tabela 2. Nenhum paciente apresentou concentrações séricas de uréia e creatinina elevadas. Observou-se que, os níveis séricos de uréia estavam abaixo da faixa de normalidade em 50% dos pacientes e a maioria deles (100/124) também mostrou-se com níveis séricos de

creatinina abaixo da faixa de normalidade para idade e sexo. Os níveis séricos de bilirrubina apresentaram-se elevados pelo aumento dos níveis de bilirrubina indireta e reticulocitose estava presente na maioria (97,3 %) dos indivíduos. A média das concentrações séricas de hemoglobina total mostrou-se abaixo dos valores de referência e a média dos níveis séricos de DHL apresentou-se bastante elevada com uma variabilidade acentuada entre os pacientes.

Tabela 2- Características laboratoriais dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

VARIÁVEIS	MÉDIA $\pm$ DP	INTERVALO	INTERVALO NORMAL
Uréia (mg/dL)	14,4 $\pm$ 4,4	5 a 25	15 a 43
Creatinina (mg/dL)	0,36 $\pm$ 0,1	0,1 a 0,7	0,5 a 1,25
Bili total (mg/dL)	4,45 $\pm$ 3,0	1,3 a 20,0	0,2 a 1,3
Reticulócitos (%)	6,22 $\pm$ 3,19	0,9 a 17,1	0,5 a 1,5
Hb (g/dL)	8,1 $\pm$ 1,2	5,47 a 12,2	11,1 a 16,0
DHL (U/L)	1464 $\pm$ 658,2	476 a 3723	313 a 618
AST (U/L)	55,8 $\pm$ 21,6	12 a 128	14 a 59
ALT (U/L)	32,69 $\pm$ 11,4	16 a 70	09 a 72
Plaquetas ($\times 10^3$)	405,9 $\pm$ 124,9	132 a 955	150 a 450

AST: Aspartato transaminase; AL: Alanina transaminase; H: Hemoglobina; DHL: Dehidrogenase láctica; Bili total: Bilirrubina total

A albuminúria estava presente em 26/124 pacientes. O paciente mais jovem a apresentar microalbuminúria tinha dez anos de idade e 25 % dos pacientes com microalbuminúria tinham até 15,3 anos de idade (Tabela 3). A frequência de microalbuminúria foi de 19,4 % (24/124) com IC 95 % de 12,9 a 26,6. Macroalbuminúria foi observada em dois dos 26 pacientes com albuminúria.

Tabela 3- Proporção de pacientes com Anemia Falciforme com microalbuminúria de acordo com a idade atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe

%	Idade
5	10
10	10,5
25	15,3
50	19
75	22
90	27,5
95	31

A frequência da microalbuminúria aumentou com a idade ($p < 0,02$). Assim, na faixa etária de cinco a 10 anos, a frequência da microalbuminúria foi de 7,1 % aumentando para 20 % na faixa etária de 10 a 20 anos. Após os 20 anos de idade, 64,3 % dos pacientes apresentaram microalbuminúria (Figura 5).

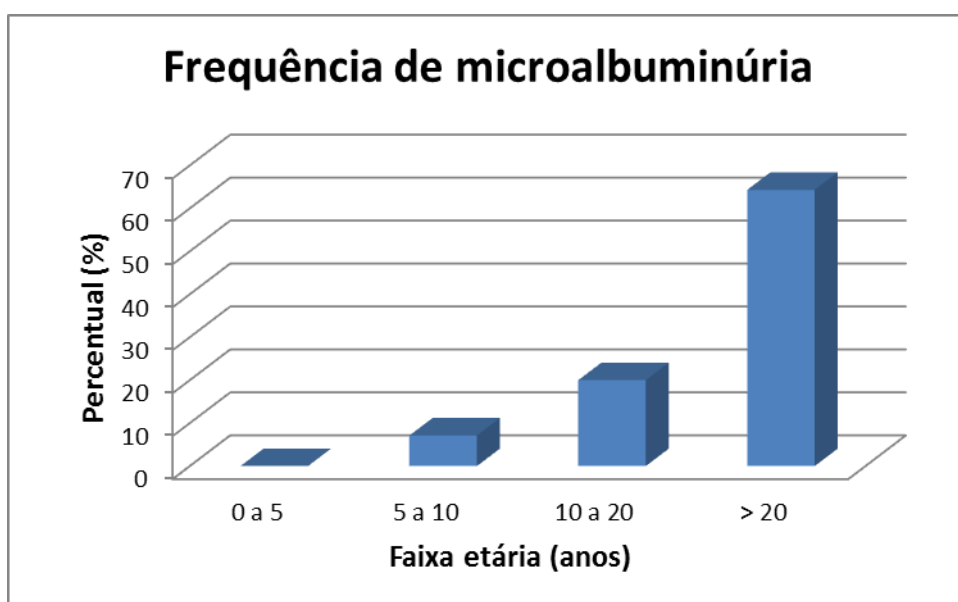


Figura 5- Distribuição da frequência da microalbuminúria nos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, de acordo com a faixa etária.

A frequência de proteinúria total (albuminúria + outras proteínas) foi de 18,5 % (23/124) com IC 95 % de 11,3 a 26,6. Observou-se que 11,2 % (11/98) dos pacientes com elevação de proteinúria total não apresentaram elevação de microalbuminúria. A média de idade destes pacientes foi de 15,4 anos com mínima de nove anos e máxima de 26 anos. Dos pacientes em uso de hidroxiuréia, 45,4 % (10/22) apresentaram elevação de microalbuminúria e/ou proteinúria.

Para avaliar o comportamento das variáveis em relação à presença ou não de microalbuminúria, os pacientes foram separados em grupos: um grupo formado pelos pacientes que apresentaram elevação nos níveis de microalbuminúria e outro formado pelos pacientes sem elevação de microalbuminúria. Do mesmo modo procedeu-se em relação à proteinúria total. A média de idade foi superior nos pacientes com microalbuminúria ($p < 0,0001$), com diferença média de $7,2 \pm 1,3$ anos, com IC 95 % de 4,6 a 9,8. A média de idade também foi superior nos pacientes com proteinúria. Não houve diferença significativa na frequência de microalbuminúria entre os sexos masculino e feminino ($p=0,10$). Quanto à proteinúria total, a frequência entre os sexos também não alcançou diferença significativa ($p = 0,65$).

Em relação à média dos níveis séricos de DHL, não houve diferença significativa nos pacientes com ou sem microalbuminúria ou com ou sem proteinúria total. Pacientes com elevação nos níveis de microalbuminúria ou proteinúria também não apresentaram diferença significativa quanto à média dos valores do ClCr, em relação àqueles sem elevação da microalbuminúria ($p=0,82$) e sem proteinúria total ($p=0,24$). O mesmo acontecendo com a média dos níveis de hemoglobina que

também não apresentaram diferença significativa nos dois grupos de pacientes (Tabela 4).

Tabela 4- Comparação entre variáveis demográficas e bioquímicas dos pacientes com Anemia Falciforme com e sem microalbuminúria e proteinúria atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

VARIÁVEIS	Com Malb (n= 24)	Sem Malb (n=98*)	P	Com Prot (n= 23)	Sem Prot (n= 101)	P
Idade (anos)	19,0 $\pm$ 5,8	11,8 $\pm$ 5,7	<0,0001	17,5 $\pm$ 5,1	12,3 $\pm$ 5,1	<0,0001
Sexo ¹ (%)	M	10 (41,7)	0,1	12,0 (52,2)	58 (57,4)	0,65
	F	14 (58,3)		11,0 (47,8)	43 (42,6)	
DHL (U/L)	1379,8 $\pm$ 646,6	1446,0 $\pm$ 614	0,64	1615 $\pm$ 812,9	1429,7 $\pm$ 620,8	0,22
ClCr (mL/24h/1,73)	164,9 $\pm$ 61,2	162,0 $\pm$ 51,9	0,82	175,9 $\pm$ 61,4	161,2 $\pm$ 52,3	0,24
Hb (g/dL)	8,7 $\pm$ 1,8	8,0 $\pm$ 1,0	0,06	8,7 $\pm$ 1,6	8,0 $\pm$ 1,1	0,058

¹ Teste qui-quadrado. Demais: Teste t de Student ClCr: Clearance de Creatinina; Hb: Hemoglobina; DHL: Desidrogenase láctica ; Malb: microalbuminúria ; Prot: Proteinúria ; *Não foram incluídos 2 pacientes que estavam com macroalbuminúria

Uma grande proporção dos pacientes apresentou hiperfiltração glomerular. A taxa de filtração glomerular estava elevada em 63,7 % (79/124), média de 194,47 $\pm$ 42,78 mL/24h/1,73m², mínima 140,0 e máxima 353,0 mL/24h/1,73m², e reduzida em 5,6 % (07/124) dos pacientes, média 81,04 $\pm$ 6,0 mL/24h/1,73m², mínima 73 mL/24h/1,73m² e máxima 88,0 mL/24h/1,73m² (Figura 6).

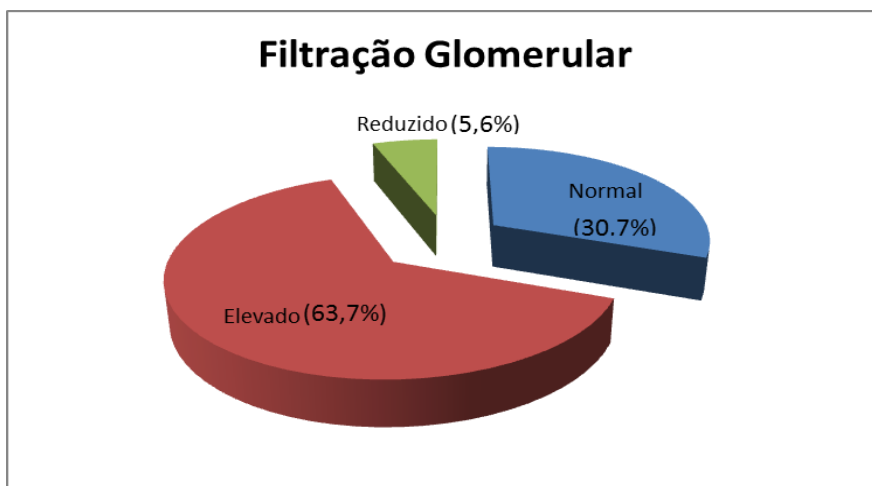


Figura 6- Frequência da filtração glomerular nos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Observou-se que a hiperfiltração glomerular começou precocemente. A figura 7 mostra que a ocorrência da hiperfiltração aumenta com a idade e, sua frequência começa a diminuir após a segunda década de vida, período em que aumenta a ocorrência de TFG reduzida.

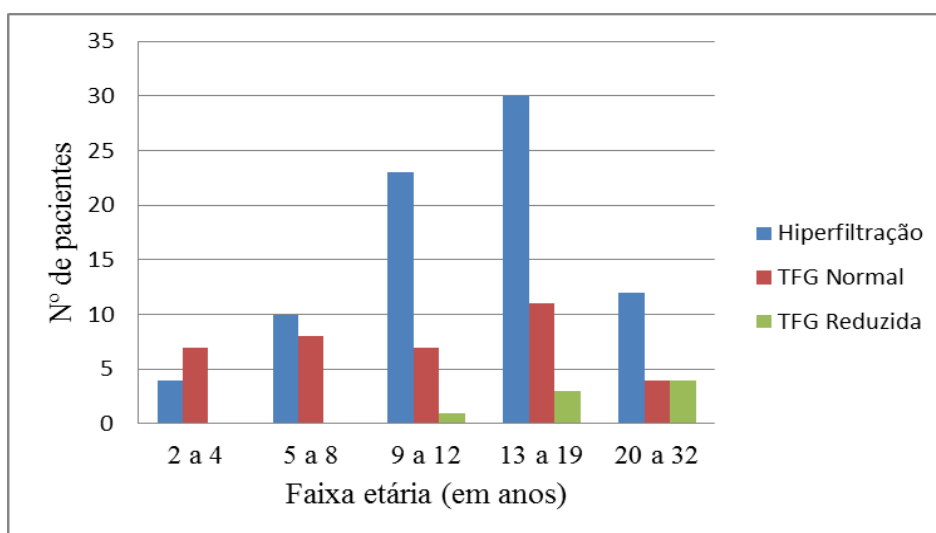


Figura 7- Distribuição da Taxa de Filtração Glomerular (TFG) entre os grupos etários dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

A hiperfiltração estava presente em 70,8 % (17/24) dos pacientes com microalbuminúria e em 73,9 % (17/23) dos pacientes com proteinúria total. Porém a maior frequência de hiperfiltração ocorreu em pacientes sem microalbuminúria ou proteinúria total (Figura 8).

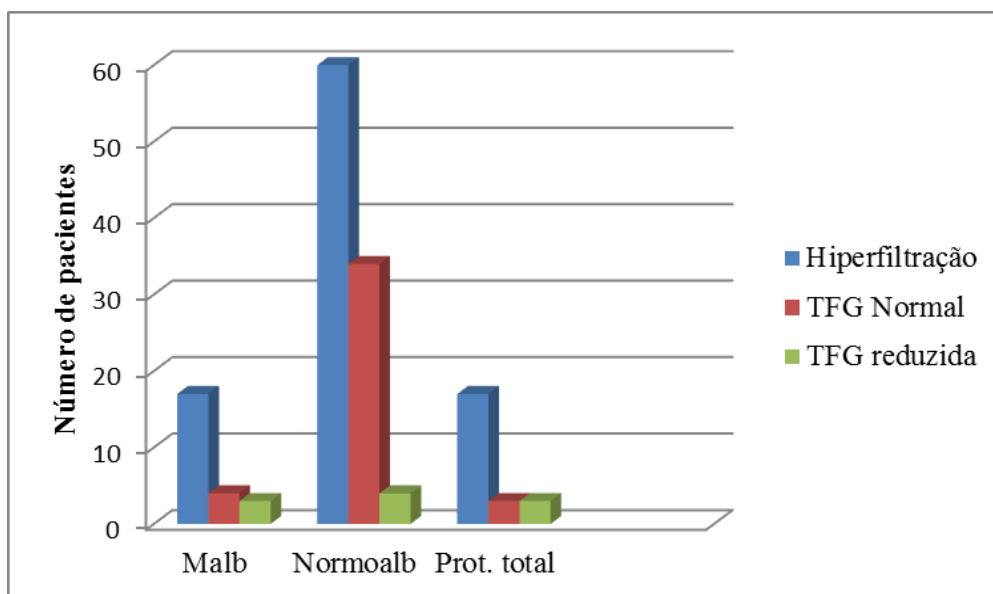


Figura8- Distribuição dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe de acordo com Taxa Filtração Glomerular (TFG) e a presença ou não de microalbuminúria (Malb) e proteinúria total (Prot. Total). Normoalb: Normoalbuminúria

Procedeu-se uma análise de correlação entre os vários marcadores de lesão renal e diversas variáveis laboratoriais que mostrou correlação significativa positiva entre os níveis de DHL com Proteinúria, microalbuminúria, reticulócitos, AST, leucócitos, bilirrubinas total e indireta e correlação negativa com níveis de hemoglobina. A microalbuminúria não se correlacionou com a hemoglobina e nem com reticulócitos (Tabela 5).

Tabela 5: Correlação entre os marcadores de lesão renal e as variáveis laboratoriais em pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Variáveis	r	p
DHL x Prot	0,327	0,00002
DHL x Malb	0,294	0,001
DHL x Hemoglobina	-0,441	< 0,0001
DHL x Reticulócitos	0,289	0,02
DHL x ClCr	0,175	0,052
DHL x Bili total	0,387	< 0,0001
DHL x Bili indireta	0,395	< 0,0001
DHL x AST	0,730	< 0,0001
DHL x ALT	0,144	0,110
DHL x Leucócitos	0,390	< 0,0001
Malb x ClCr	0,198	0,027
Malb x Prot	0,852	< 0,0001
Malb x Reticulócitos	0,048	0,612
Malb x Hemoglobina	0,049	0,597
Prot x ClCr	0,196	0,029
Prot x idade	0,367	< 0,0001
ClCr x Creat	-0,408	< 0,0001

Correlação de Pearson. DHL: Desidrogenase láctica; Prot: proteinúria; Malb: microalbuminúria; ClCr: clearance de creatinina; Bili: bilirrubina; Creat: creatinina; AST: Aspartato transaminase; ALT: Alanina transaminase

Para saber quais variáveis estariam relacionadas de modo independente com DHL, utilizou-se o modelo de regressão linear múltipla. Foram incluídas as variáveis independentes: idade, microalbuminúria, hemoglobina, reticulócitos e ClCr. Observou-se que a DHL está associada positivamente, de forma independente, com

microalbuminúria, mas também está associada com reticulócitos e negativamente com os níveis de hemoglobina. O coeficiente de regressão ajustado foi de 0,310 indicando que hemoglobina, reticulócitos e microalbuminúria explicam 31 % da variabilidade da DHL.

Tabela 6: Regressão linear múltipla ilustrando as variáveis associadas independentemente à DHL dos pacientes com Anemia Falciforme atendidos no Ambulatório do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Variáveis	B	Erro padrão	β padronizado	p
Intercepto	2987,9	366,9	-	< 0,0001
Hemoglobina	- 227,4	40,8	-0,448	< 0,0001
Microalbuminúria	1,74	0,56	0,248	0,002
Reticulócitos	44,5	17,5	0,205	0,01

Regressão linear múltipla. R^2 ajustado: 0,310. Variável dependente: DHL. Variáveis independentes incluídas: idade, clearance de creatinina, hemoglobina, microalbuminúria e reticulócitos.

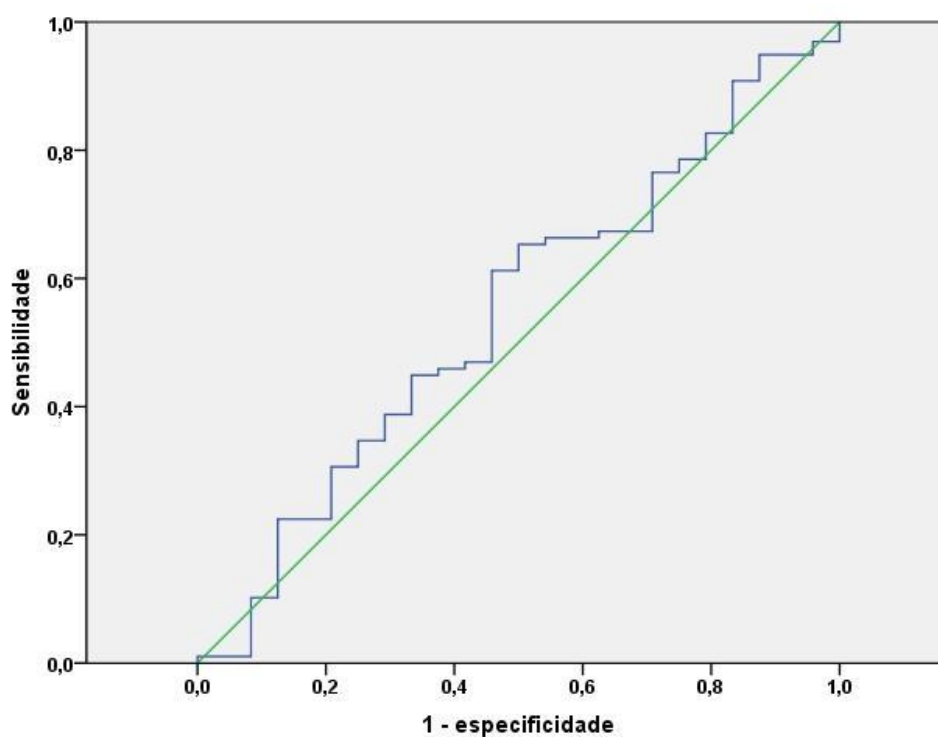


GRÁFICO 1- Curva ROC mostrando a sensibilidade e a especificidade para discriminar microalbuminúria a partir dos diversos pontos de corte da DHL

Realizou-se também uma análise da associação da presença da microalbuminúria com os níveis de DHL, através da curva ROC que mostrou uma área sob a curva de $0,545 \pm 0,066$ com IC 0,415 a 0,675 e $p = 0,49$. Isto é, não existe um ponto de corte para a DHL que discrimine, de forma significativa, a presença de microalbuminúria.

6 DISCUSSÃO

Estudos mostraram que complicações renais são mais comuns e ocorrem em idade mais precoce em pacientes com doença falciforme do que na população normal (POWARS *et al*, 1991; WESSON *et al*, 2002). As frequências de microalbuminúria e de proteinúria observadas na amostra estudada estão de acordo com os resultados de outros autores que relataram frequência de microalbuminúria variando de 18 a 28 % numa população de até 20 anos, (ALVAREZ *et al*, 2008; DATTA *et al*; 2003; MCKIE, *et al*, 2007; MARSENIC *et al*, 2008).

A presença de microalbuminúria na população jovem com Anemia Falciforme pode preceder o desenvolvimento de macroalbuminúria (proteinúria) em adultos (DHARNIDHARKA *et al*, 1998; WIGFALL *et al*, 2000) e, neste estudo a microalbuminúria foi observada em pacientes a partir de 10 anos de idade. Esta precocidade na ocorrência da microalbuminúria foi observada também por Alvarez *et al*, (2008), Dharnidharka *et al*, (1998), Datta *et al*, (2003) e Marsenic *et al*, (2008). Semelhantemente aos relatos desses autores, este estudo mostrou que o aumento de idade apresentou-se como fator importante para ocorrência de microalbuminúria e proteinúria, uma vez que a frequência destes biomarcadores aumentou com a idade. Os estudos de Datta *et al* (2003) mostraram que, dos pacientes com microalbuminúria, 14,3 % tinham menos de 9 anos e esta frequência subia para 33,3 % nos pacientes acima de 9 anos de idade. Essa relação com a idade também foi observada por Wigfall *et al* (2000) que mostraram o desenvolvimento de microalbuminúria em crianças ainda mais jovens, a partir de 4 a 7 anos, e que se desenvolveu em mais de 10 % dos pacientes adolescentes. Do mesmo modo,

resultados sugerindo uma maior frequência da microalbuminúria com o avançar da idade, foram observados por Guasch *et al* (2006) num estudo envolvendo 184 pacientes somente adultos com HbSS (média de idade de 32 anos). Esses autores mostraram 42 % de pacientes com microalbuminúria e 26 % com macroalbuminúria (proteinúria). Dos pacientes com proteinúria, 20 % estavam na faixa etária de 18 a 30 anos e a frequência aumentava para 40 % nos pacientes acima de 40 anos de idade.

A ocorrência de 11,2 % de pacientes apresentando proteinúria total elevada sem alteração de microalbuminúria pode indicar que outros tipos de proteínas sejam responsáveis por esta elevação. Isto sugere que pode estar havendo proteinúria de origem não glomerular e a lesão renal não teria sido identificada se somente microalbuminúria tivesse sido testada. Resultados semelhantes também foram observados por Alvarez *et al* (2006), num estudo realizado com 120 pacientes com doença falciforme. Esses autores verificaram uma proporção de 14,6 % de pacientes com elevação de β_2 microglobulina, que é uma proteína de origem tubular, sem elevação da albuminúria. Do mesmo modo, Marsenic *et al* (2008) encontraram 41 % de pacientes com proteinúria e, destes, 61,5 % tinham proteinúria elevada sem aumento de microalbuminúria. Nesse estudo, além da albuminúria, foi verificada também a excreção de IgG e proteína carreadora de retinol, que é um marcador de disfunção tubular proximal. Esses autores observaram que 16 % dos pacientes com excreção elevada de proteína carreadora de retinol não apresentaram aumento de albuminúria e 46 % dos pacientes com excreção elevada de proteinúria total não apresentaram elevação de nenhuma das proteínas testadas.

A patogênese da nefropatia falciforme é complexa e ainda não é bem entendida. Relatos em adultos com Anemia Falciforme mostram que o desenvolvimento de proteinúria pode progredir para IRC (POWARS *et al*, 1991), no entanto, nem todos os pacientes irão desenvolver proteinúria e não se sabe quais pacientes com Anemia Falciforme irão progredir para IRC. Portanto, é importante a monitorização dos biomarcadores de lesão renal desde a infância para identificar crianças portadoras de HbSS com potencial de risco futuro de IRC. No presente estudo não foram realizadas dosagens de outras proteínas na urina, além da albuminúria, por não ser o foco da pesquisa, mas os dados encontrados ampliam os resultados de Alvarez *et al* (2006) e Marsenic *et al* (2008) e sugerem a necessidade de um estudo mais abrangente sobre a ocorrência de proteinúria de origem não glomerular nesses pacientes, principalmente se for considerada a idade precoce (nove anos) em que ocorreu a proteinúria sem microalbuminúria. Além disso, ressalta a necessidade de dosagens de rotina de proteinúria total nos pacientes com Anemia Falciforme para assegurar a identificação de lesão renal precoce naqueles indivíduos cuja microalbuminúria continua na faixa de normalidade. Por outro lado, por ser este um estudo transversal e considerando que tanto a microalbuminúria e proteinúria podem sofrer variações individuais entre um período e outro de coleta, não é possível afirmar se a proteinúria elevada é persistente ou transitória, devendo os dados serem interpretados com cautela.

Os dados deste estudo documentam uma grande proporção de pacientes apresentando taxa de filtração glomerular elevada que se inicia em idade precoce. A medida do ritmo de filtração glomerular é a prova laboratorial mais utilizada na avaliação da função renal e taxa e filtração glomerular elevada é uma das primeiras

manifestações de nefropatia falciforme estando associada, provavelmente, com hemólise crônica (HAYMANN *et al*, 2010). No presente estudo, a frequência de hiperfiltração aumentou com a idade e mostrou maior frequência no início da segunda década de vida. Após esse período a ocorrência de hiperfiltração começou a declinar e aumentou a frequência de taxa de filtração glomerular diminuída (Figura 7). Resultados semelhantes foram obtidos por Wigfall *et al*, (2000) e Aygun *et al*, (2011) e esta redução da taxa de filtração glomerular após a segunda década de vida provavelmente reflete piora da função filtrativa renal, apesar de alguns valores da taxa de filtração glomerular, no presente estudo, ainda estarem na faixa normal ou ainda ligeiramente elevada nesta faixa etária. A baixa frequência de taxa de filtração glomerular diminuída se deve à faixa etária da população ser de crianças e jovens adultos.

Os níveis de ClCr se correlacionaram com a microalbuminúria e a proteinúria. Como mostrado por Haymann *et al* (2010), foi observado uma alta proporção de pacientes com microalbuminúria apresentando hiperfiltração glomerular, aumentando a possibilidade de que hiperfiltração pode levar à lesão glomerular e com o tempo resultar em proteinúria. O acompanhamento destes pacientes seria importante para verificar se ocorrerá queda da função renal nestes indivíduos e se estes constituem grupo de risco para IRC.

Os pacientes deste estudo apresentaram níveis de creatinina abaixo da faixa de normalidade. Os maiores influenciadores dos níveis de creatinina são IMC e taxa de filtração glomerular. Como os pacientes com Anemia Falciforme possuem baixo peso corporal e muitos apresentam hiperfiltração glomerular, os valores de creatinina

são mais baixos que o esperado e adicionalmente reduzidos pela hipersecreção tubular de creatinina (BALLAS *et al* 2009), embora alguns pacientes com IMC normal também possuíam creatinina sérica abaixo da faixa de normalidade. Thompson *et al* (2007) relataram dados semelhantes e sugerem valores de referência menores para creatinina em pacientes com Anemia Falciforme, o que permitiria o reconhecimento de insuficiência renal mais precocemente.

Pacientes com Anemia Falciforme têm anemia hemolítica e, como esperado, neste estudo, os pacientes deste estudo apresentaram valores de hemoglobina abaixo da faixa de normalidade e alta percentagem de reticulócitos (Tabela 2). Alguns autores como Becton *et al* (2010), Gurkan *et al* (2010) e Wigfall *et al* (2000) têm observado níveis de hemoglobina significativamente menores em pacientes com microalbuminúria. Na amostra estudada, a média dos valores de hemoglobina foi menor para os pacientes sem microalbuminúria e sem proteinúria total, porém esta diferença não alcançou significância estatística.

A maioria dos pacientes (95 %) apresentou níveis séricos de DHL elevados, com uma variabilidade acentuada entre os indivíduos. A DHL é um marcador de hemólise, que é um mecanismo apontado como responsável por complicações em vários órgãos na Anemia Falciforme, inclusive complicações renais, em razão do aumento do fluxo sanguíneo renal, vaso-oclusão e consequente disfunção do órgão envolvido (STYPULKOWSKI, 2010), sendo citada por alguns autores como possível indicador de lesão renal nesses pacientes (GURKAN *et al*, 2010).

Para responder à pergunta de quais marcadores de lesão renal estariam associados com a DHL, a análise de correlação entre os vários marcadores de lesão

renal e de hemólise com essa variável laboratorial mostrou correlação, embora moderada, entre os níveis de DHL e microalbuminúria e proteinúria. No entanto, a análise univariada mostrou também que a DHL se correlacionou com marcadores de hemólise. Para saber quais variáveis estariam associadas de modo independente com a DHL, o modelo de regressão linear múltipla mostrou uma associação significativa entre os níveis de DHL e microalbuminúria, mas mostrou também uma associação negativa com os níveis de hemoglobina, por conta da destruição dos eritrócitos. Isto também fica evidente pela associação positiva com reticulócitos e correlação com AST, refletindo a associação com mecanismos de hemólise. Além disso, diferentemente do estudo realizado por Gurkan *et al* (2010), quando comparado por grupo de pacientes com e sem microalbuminúria ou com e sem proteinúria total, a diferença entre os níveis de DHL não alcançou significância.

A origem da DHL é muito variada, pois, além dos eritrócitos e tecido renal, esta enzima pode ser produzida por vários outros tecidos. A evolução da Anemia Falciforme é marcada por um amplo espectro de complicações clínicas que atingem a maioria dos órgãos e aparelhos (CANÇADO, 2007; KATO *et al*, 2007; ZAGO *et al*, 2007). Deste modo, lesões em qualquer um dos órgãos e tecidos que sejam fontes de DHL, provocam elevações séricas significantes dessa enzima (MOTA, 2009), podendo, portanto, ser também responsáveis pelas alterações nos níveis de DHL nos pacientes com Anemia Falciforme. A associação desta enzima, no presente estudo, com marcadores que indicam gravidade hemolítica, sugere que a hemólise intravascular é a fonte dominante para os níveis elevados de DHL encontrados nos pacientes estudados. Esta afirmação é reforçada pela correlação de DHL com AST e a não correlação com ALT, pois a AST encontra-se em maior concentração nas

células vermelhas do sangue do que a ALT (MOTA, 2009), sendo também liberada durante a hemólise. Além disso, a análise da associação da presença da microalbuminúria com a DHL mostrou que níveis de DHL não são capazes de discriminar de forma significativa a presença de microalbuminúria. Assim, não é possível afirmar que alterações nos níveis de DHL são indicativas de lesão renal nestes pacientes.

Estudos realizados por O'Driscoll *et al* (2008) e Aygun *et al* (2011), diferentemente de Gurkan *et al* (2010), não encontraram correlação entre microalbuminúria e DHL. Os resultados do presente estudo sugerem que os relatos mostrados por Gurkan *et al* (2010) foram prejudicados pelo número pequeno de pacientes estudado (40 pacientes com três tipos de doença falciforme: HbSS, HbSC, HbS β). Este estudo envolveu um número maior de indivíduos e todos com HbSS, que vem a ser a forma mais grave da doença e, conseqüentemente, apresentam valores diferentes e mais graves para os vários biomarcadores laboratoriais. No entanto, estudos longitudinais talvez revelem resultados diferentes.

7 CONCLUSÃO

O estudo confirma a ocorrência precoce de microalbuminúria, proteinúria e hiperfiltração glomerular relatada para a população com Anemia Falciforme. O estudo mostrou também que outros tipos de proteínas podem ser responsáveis pela proteinúria nestes pacientes ao revelar a ocorrência de proteinúria sem elevação de albuminúria.

Conclui-se que a DHL se correlacionou com microalbuminúria, mas também se correlacionou com marcadores de hemólise. Além disso, níveis de DHL apresentaram uma variabilidade acentuada de modo independente da microalbuminúria e não foram capazes de discriminar os pacientes com ou sem microalbuminúria, sugerindo que a associação com lesão renal não é específica, uma vez que houve associação com marcadores de hemólise.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Sugere-se acompanhamento em longo prazo de pacientes com Anemia Falciforme que apresentem concomitantemente microalbuminúria/proteinúria com hiperfiltração para verificar se haverá queda na função renal neste grupo específico de pacientes e mais estudos sobre a ocorrência de proteinúria de origem não glomerular na população com Anemia Falciforme.

Há necessidade também de mais estudos, incluindo estudos longitudinais, envolvendo a enzima DHL e marcadores de lesão renal que, talvez, apresentem resultados diferentes para a DHL, pois a identificação de novos biomarcadores de lesão renal é importante para o desenvolvimento de um modelo preciso de nefropatia falciforme com o objetivo de identificar precocemente as lesões subclínicas e os pacientes em risco para doença renal crônica. Isto possibilitaria a introdução de tratamentos mais específicos para impedir ou retardar a progressão para IRC.

REFERÊNCIAS

- ALVAREZ, O. *et al.* Early blood transfusions protect against microalbuminúria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Blood Cancer**, USA, v.47, n.1, p.71-76, Jul. 2006.
- ALVAREZ, O; LOPEZ-MITNIK G; ZILLERUELO G. Short-term follow-up of patients with sickle cell disease and albuminuria. **Pediatr Blood Cancer**, USA, v. 50, n.6, p.1236–1239, Jun. 2008.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care. v. 4, n.1. Disponível em: <<http://www.care.diabetesjournals.org>> Acesso em: 12 jun. 2011
- ATAGA, K.I. *et al.* Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: A longitudinal study. **Br J Haematol**, USA, v.134, n.1, p.109-115, Jul. 2006.
- AYGUN, B, *et al.* Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Nephrol**, USA, v.26, n.8, p.1285-1290, Aug. 2011.
- BALLAS, S.K . *et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am J Hematol**, USA, v.85, n.1, p. 6-13, Jan. 2009.
- BASTOS, M. G.; MARTINS, G. A.; PAULA, R. B. Diagnóstico diferencial na hematúria. **J Bras Nefrol**, Brasil, v. 20, p. 425-40, Ago.1998.
- BATISTA, A; ANDRADE, T.C. Anemia falciforme: um problema de saúde pública no Brasil. **Universitas Ciências da Saúde**, Brasil, v.3, n.1, p.83-99, 2005.
- BECTON, L.J. *et al.* Prevalence and clinical correlates of microalbuminúria in children with sickle cell disease. **Pediatr Nephrol**, USA, v.25, n.8, p.1505-1511, Aug. 2010.
- BECKER, A.M. Sickle cell nephropathy: challenging the conventional wisdom. **Pediatr Nephrol**, USA, v.26, n.12, p.2099-2109, Dec. 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Manual de diagnóstico e tratamento das doenças falciformes**, Brasília. 2002. 31p
- CANÇADO, R.D. Doenças falciformes. **Prática Hospitalar**. Brasil, v.9, n.50, p.61-64, Mar-Abr. 2007.
- CANÇADO, R.D; JESUS, J.A. A doença falciforme no Brasil. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter**, Brasil, v.29, n.3, p. 203-206, jul-Set. 2007.

CIPOLOTTI, R. *et al.* Childhood and adolescent growth of patients with sickle cell disease in Aracaju, Sergipe, northeast Brazil. **Ann Trop Pediatr.** USA, v.20, n.2, p.109-113, Jun. 2000.

DATTA, V. *et al.* Microalbuminuria as a Predictor of Early Glomerular Injury in Children with Sickle Cell Disease. **Indian Journal of Pediatrics**, Indian, v. 70, n.4, p. 307-309, Apr. 2003.

DHARNIDHARKA, V.R. *et al.* Prevalence of microalbuminúria in children with sickle cell disease. **Pediatr Nephrol**, USA, v. 12, p. 475-478, Mar. 1998.

FERREIRA, L.M.B.P; CIPOLLOTTI, R; COUTINHO, H.M. Frequência de portadores de hemoglobinopatias em puérperas e seus recém-nascidos. **Rev. Bras. Hematol Hemoter**, Brasil, v.31, n.5, p. 391-392, Maio. 2009.

GALIZA NETO, G.C; PITOMBEIRA, M.S. Aspectos moleculares da anemia falciforme. **J. Bras. Patol. Méd. Lab.** Brasil, v.39, n.1, p. 51-56, Maio. 2003.

GLADWIN, M.T. *et al.* Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. **N England J Med**, USA, v.350, n.9, p. 886–895, Feb. 2004.

GUASCH, A; *et al.* Glomerular Involvement In Adults With Sickle Cell Hemoglobinopathies: Prevalence And Clinical Correlates Of Progressive Renal Failute. **J Am Soc Nephrol**, USA, v..17, p. 2228-2235, May. 2006.

GURKAN, S. *et al.* Lactate Dehydrogenase as a predictor of kidney involvement in patients with sickle cell anemia. **Pediatric Nephrology**, USA, v. 25, n.10, p. 2123-2127, Oct. 2010.

HASSELL, K.L. Population estimates of sickle cell disease in the U.S. **Am J Prev Med**, USA, v.38, n.4, p.S512-521, Apr. 2010.

HAYMANN, J.P. *et al.* Glomerular Hyperfiltration in Adult Sickle Cell Anemia: a frequent hemolysis associated feature. **Clin J Am Soc Nephrol**, USA, v.5, n.5, p.756-761, May. 2010.

KATO, G.J. *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, USA, v.107, n.6, p. 2279-2285, Mar. 2006.

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

KLIEGMAN, R.M. *et al.* **Nelson, Princípios de Pediatria.** Trad. de Nelson essentials of pediatrics 5ª ed. Rio de janeiro: Elsevier, 2006. P. 710-713, 757-776.

KOREN, A. *et al.* Sick cell anemia in northern Israel: screening and prevention. **Isr Med Assoc J.** Israel, v.11, n.4, p.229-234, Apr. 2009.

LEVEY, A.S. *et al.* National Kidney Foundation Practice Guidelines for Chronic Kidney Disease: Evaluation, Classification and Stratification. **Ann Intern Med.** USA, v.139, n.2, p.137-147, Jul. 2003.

LOPEZ, F.A; CAMPOS JUNIOR, D. **Tratado de Pediatria.** Sociedade Brasileira de Pediatria. 2ª ed. São Paulo: Manole, 2010. 1839-1844

LOUREIRO, M.M; ROZENFELD, S. Epidemiology of sickle cell disease hospital admissions in Brazil. **Rev. Saúde Pública.** Brasil, v.39, n.6, p.943-949, Dec. 2005.

MAGALHÃES, I.Q. Renal abnormalities in sickle cell disease. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter,** Brasil, v.29, n.3, Jul-Sep. 2007.

MAGRO, M.C.S; VATTIMO, M.F. Evaluation of renal function: creatinine and other biomarkers. **Rev. Bras. Ter. Intensiva,** Brasil, v. 19 n. 2, p. 182-185, Apr-Jun. 2007.

MARCONDES, E. *et al.* **Pediatria Básica;** Pediatria Clínica Especializada. 9ª.ed. São Paulo: Sarvier, 2004. Tomo III. p.317-326, 386-387.

MARSENIC, O; COULOURES, K.G; WILEY, J.M. Proteinuria in children with sickle cell disease. **Nephrol Dial Transplant,** USA, v.23, n.2, p. 715–720, Feb. 2008.

MCKIE K. T. *et al.* Prevalence, prevention and treatment of microalbuminuria and proteinuria in children with sickle cell disease. **J Pediatr Hematol Oncol,** USA, v.29, n.3, p.140–144, Mar. 2007.

MINNECI, P.C. *et al.* Nitrite reductase activity of hemoglobin as a systemic nitric oxide generator mechanism to detoxify plasma hemoglobin produced during hemolysis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** , USA, v. 295, n.2, p. 743-754. Jun. 2008

MOTA, V.T. **Bioquímica Clínica:** Princípios e Interpretações. 5ª ed. São Paulo: Medbook, 2009. v. 9, p. 99- 110.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION – Kidney Disease: Outcomes Quality Initiative (K/DOQI) Disponível em: < www.kdigo.org/guidelinescompare/kdoqi> Acesso em: 15 mai. 2011.

NAOUM, P.C; NAOUM, F.A. **Doença falciforme:** A falcização. Disponível em: <www.hemoglobinopatias.com.br> Acesso em: 05 jun. 2011.

NHLBI- NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH - *National Heart, Lung, and Blood Institute* **The management of sickle cell disease.** Division of Blood Diseases and Resources. 4ª ed. USA: NIH Publication, Jun 2002 v.19, n. 2-2117, p.123-127.

- NIANG, A. *et al.* Sick cell Disease and the Kidney. **Saudi J Kidney Dis Transplant**, Senegal, v.15, n.2, p. 180-184, Apr-Jun. 2004
- O'DRISCOLL, S. *et al.* Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. **Br J Haematol**, USA, v.140, n.2, p. 206-209, Jan. 2008.
- OLIVEIRA, R.A.G; NETO, A.P. **Anemias e leucemias: conceitos básicos e diagnóstico por técnicas laboratoriais**. 1ª ed. São Paulo: Roca, 2004. 436p
- PECOITS-FILHO, R. Diagnóstico de Doença Renal Crônica: Avaliação da Função Renal. **J. Bras. Nefrol.** Brasil, v. XXVI n. 3 (Supl 1), Ago. 2004.
- PINHEIRO L.S. *et al.* Prevalência de Hemoglobina S em recém-nascidos de Fortaleza: importância da investigação neonatal. **Rev Bras Ginecol Obstet.** Brasil, v. 28, n.2, 122-125, Mar. 2006
- PLATT, O.S. *et al.* Mortality in sickle cell disease- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. **N Engl J Med**, USA, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, jun. 1994.
- POWARS, D.R. *et al.* Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. **Ann Intern Med**, USA, v.115, n.8, p.614-620, Oct. 1991.
- POWARS, D.R *et al.* Outcomes of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Med Baltim**, USA, v.84, n.6, p.363-376, Nov. 2005.
- QUINN, CT. *et al.* Improved survival of children and adolescents with sickle cell disease. **Blood**, USA, v.115, n.17, p.3447-3452, Mar. 2010.
- RAMALHO, A.S; MAGNA, L.A; SILVA, R.B.P. A. Portaria nº 822/01 do Ministério da Saúde e as peculiaridades das hemoglobinopatias em saúde pública no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Brasil, v.19, n.4, p.1195-1199, Jul-Ago. 2003.
- REITER, C.D. *et al.* Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle cell disease. **Nat Med**, USA, v.8, n.12, p.1383-1389, Dec. 2002..
- ROTHER, R.P. *et al.* The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **JAMA**, USA, v. 293, n.13, p. 1653-1662, Apr. 2005.
- SERJEANT, G.R. *et al.* The changing face of homozygous sickle cell disease: 102 patients over 60 years. **Int J Lab Hematol**, Jamaica, v.31, n.6, p.585-596, Dec. 2009.
- SESSO, R; ALMEIDA, M.A; FIGUEIREDO, M.S; BODIN, J.O. Renal dysfunction in patients with sickle cell anemia or sickle cell trait. **Braz J Med Biol Res**, Brasil, v. 31, n.10 p. 1257-1262, Oct. 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE NEFROLOGIA. Disponível em: <<http://www.sbn.org.br>> Acesso em: 10 Jun. 2011.

STUART, M.J & NAGEL, R. L. Sick cell disease. **Lancet**, USA, v.364, p. 1343-1360, Oct. 2004.

STYPULKOWSKI, J. B; MANFREDINI, V. Alterações hemostáticas em pacientes com doença falciforme. **Rev Bras Hematol Hemoter**, Brasil, v.32, n.1, p. 56-62, Fev. 2010.

TAYLOR, J.G. *et al.* Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vaso-occlusive pain. **PLoS One**, USA, v.3, n.5, p.e2095, May. 2008.

THOMPSON, J. *et al.* Albuminuria and Renal Function in Homozygous Sickle Cell Disease. Observations From a Cohort Study. **Arch Intern Med**, USA, v.167, n.7, p.701-708, Apr. 2007.

VAN BEERS E.J. *et al.* Sick cell disease-related organ damage occurs irrespective of pain rate: implications for clinical practice. **Haematologica**, Holland, v.93, n.5, p.757-760, May. 2008.

VICKINSKY, E. *et al.* Newborn screening for sickle cell disease: effect on mortality. **Pediatrics**. USA, v.81, n.6, p.749-755, Jun. 1988.

WESSON, D.E. The initiation and progression of sickle cell nephropathy. **Kidney Int**. USA, v.61, n.6, p. 2277-2286, Jun. 2002.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2011. Disponível em <<http://www.who.int/genomics/public/geneticdisease>> Acesso em: 05 jun. 2011.

WIERENGA, K.J; HAMBLETON, I.R; LEWIS, N.A. Survival estimates for patients with homozygous sickle-cell disease in Jamaica: A clinic based population study. **Lancet**, USA, v.357, n.9257, p. 680-683, Mar. 2001.

WIGFALL, D.R *et al.* Prevalence and clinical correlates of glomerulopathy in children with sickle cell disease. **J. Pediatr**, USA, v.136, n.6, p. 749-753, Jan. 2000.

ZAGO, M.A; SILVA PINTO, A.C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter**. Brasil, v.29, n.3, p. 207-214, Jul. 2007.

APÊNDICES



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
NÚCLEO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu, _____, RG _____, declaro estar ciente da pesquisa sob o título: **“LACTATO DESIDROGENASE COMO INDICADOR DE ENVOLVIMENTO RENAL NA ANEMIA FALCIFORME”**, a qual objetiva avaliar os níveis de lactato desidrogenase (LDH) sérico como indicador precoce de envolvimento renal em pacientes com anemia falciforme atendidos no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

Estou ciente de que tenho direito a esclarecimento a qualquer momento em que o mesmo se fizer necessário, que tenho plena liberdade de recusar a participar desta pesquisa, ou, mesmo tendo aceitado e assinado este termo, de excluir meu consentimento, no todo ou em parte dos dados em qualquer fase do processo, sem que disso resulte algum prejuízo, e que os dados são confidenciais e serão mantidos em sigilo, conforme assegura a Resolução nº 196, de 10 de outubro de 1996/CONEP.

Aracaju/SE, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do Paciente ou Responsável

Ivone Camargo Damasceno Mendonça

Responsável pela Pesquisa

Rua Domício Fraga, 941, Apt. 1101- Bairro Grageru. Aracaju-Se- Fone: 9957-8841

OBS: Por sugestão da banca da qualificação o título da pesquisa mudou para “Biomarcadores de lesão na nefropatia falciforme”

ANEXOS



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR
Rua Cláudio Batista s/n –Prédio do Centro de Pesquisas Biomédicas - Bairro
Sanatório
CEP: 49060-100 Aracaju -SE / Fone/Fax:(79) 2105-1805
E-mail: cephu@ufs.br

DECLARAÇÃO

Declaro, para os devidos fins, que o Projeto de pesquisa intitulado: **“LACTATO DESIDROGENASE COMO INDICADOR DE ENVOLVIMENTO RENAL NA ANEMIA FALCIFORME”**, Nº CAAE – **4915.0.000.107-10**, sob a orientação do **Prof. Dr. Alexandre Sherlley Casimiro Onofre**, tratando-se do projeto de pesquisa apresentado como requisito para a seleção ao Programa de Mestrado em Ciências da Saúde, do Núcleo de Pós-Graduação em Medicina desta Universidade, da mestranda **Ivone Camargo Damasceno Mendonça**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Sergipe - CEP/UFS em reunião realizada dia **01/10/2010**.

Cabe ao pesquisador apresentar ao CEP/UFS, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Res. CNS 196/96).

Aracaju, 05 de outubro de 2010.


Prof. Dr. Manuel Hermínio de Aguiar Oliveira
Coordenador do CEP/UFS



NOMOGRAMA PARA DEFINIÇÃO DE SUPERFÍCIE CORPORAL

CRIANÇAS



ADULTOS



Como determinar a superfície corporal em m²:

Na coluna à esquerda, localize a altura em cm e, na da direita, o peso. Ligue os dois pontos com uma régua. O ponto de interseção na coluna do meio, identifica a superfície corporal em m².

Exemplo: Adulto, 1,80 m e 75 Kg. Superfície corporal: 1,95 m².

Obs: Utilize o nomograma-crianças para altura até 1,20 m e peso até 40Kg.

Biomarkers of Injury in Sickle Cell Nephropathy

Ivone Camargo D. Mendonça¹; Mariana Gouveia M. Ribeiro², Enaldo Vieira de Melo¹; Rosana Cipolotti¹; Fabiana Botelho de M. Onofre²; Alexandre Sherlley C. Onofre^{3*}.

¹*University Hospital, Federal University of Sergipe, Aracaju, SE, Brazil.*

²*Department of Physiology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil.*

³*Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina,
Florianópolis, SC, Brazil.*

*Corresponding author. Department of Clinical Analysis, Federal University of Santa Catarina, Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima, Trindade, Florianópolis-SC, Brazil. CEP. 88040-970. Tel.: +55-48-37219712. R.224. E-mail address: asonofre@hotmail.com

ABSTRACT

Sickle cell anemia is the most common disorder of genetic hemoglobin around the world, characterized by the presence of abnormal hemoglobin S. The phenomena of vaso-occlusion and anemia characteristics cause tissue damage leading to organ damage, including the kidneys. The various types of renal abnormalities occur primarily in the renal medulla. Clinical manifestations of sickle cell nephropathy start early, often before one year of age with glomerular hyperfiltration, hyposthenuria, distal renal tubular acidosis and, over time, increase in albuminuria. The lactate dehydrogenase (LDH) is considered an useful marker of hemolysis and its levels are very high in the presence of intravascular hemolysis, as indicated by some authors as associated with various complications related to hemolysis, including renal complications. In order to identify laboratory variables associated with renal injury in patients with sickle cell anemia, an across-sectional study was conducted in children, teenagers and young adults treated in the hematology ward of the HU-UFS, from October 2010 to June 2011. Laboratory tests were performed in 124 patients with sickle cell anemia, mean age 13.3 ± 6.4 years (2-32 years), 56.5 % were male. There was a frequency of microalbuminuria and proteinuria of 19.4 % and 18.5%, respectively. The frequency of glomerular hyperfiltration was 63.7 %. Elevation of LDH occurred in 95 % of patients and correlated positively with microalbuminuria, with percentages of reticulocytes and inversely with average rates of hemoglobin. Although univariate analysis revealed a significant positive correlation between the levels of LDH and microalbuminuria, these values were not significantly different between patients with or without microalbuminuria, suggesting that the association with renal injury is not specific, since it was also associated with markers of hemolysis. It is concluded that, levels of LDH present variability independently of microalbuminuria, because LDH levels were notable to distinguish patients with and without microalbuminuria.

Key-words: Albuminuria; lactate dehydrogenase; sickle cell anemia.

INTRODUCTION

Sickle cell anemia (SCA) is a serious disease that affects millions of people around the world and it is resulted from a genetic disorder of hemoglobin. In the U.S., SCA occurs in one in every 400 births in the African origin population and one from 1000 to 1400 births of Hispanic origin (GUASCH *et al*, 2006; WHO, 2011). In this country, about one from every 12 people of African descent carries the allele of SCA (WHO, 2011). SCA is characterized by the substitution of glutamic acid for valine at position six of the hemoglobin beta chain, resulting in abnormal hemoglobin S (HbS), which, in conditions of hypoxia, polymerizes within the red cells, giving the man elongated form similar to a sickle (BALLAS *et al*, 2009; PRABHAKAR *et al*, 2010).

Recent years have seen an improvement in care for patients with SCA, improving their survival, but, unfortunately, it is noticed an increase in long-term complications, such as the incidence of nephropathy and other renal lesions that often lead to chronic renal failure (CRF) and may lead to end-stage renal disease (POWARS *et al*, 1991; WESSON, 2002). Clinical and pathological data indicate that intravascular sickling occurs more easily in the kidneys than in any other organ, because the renal medulla has all the necessary conditions for the deoxygenation of erythrocytes containing HbS, which occurs more easily (BECTON *et al*, 2010). The first sign of renal damage still occurs early in life with a defect in urinary concentration, which can result in polyuria, nocturnal enuresis and dehydration. In some cases, the disease can progress to CRF and result in end-stage renal disease (BECTON *et al*, 2010; PLATT *et al*, 1994). Powars *et al* (2005) argue that four to 18 % of patients with SCA will develop end-stage renal disease. According to these authors, the median survival of these patients is four years and 40% will die after 20 months of dialysis.

In consequence of it, there is an increasing concern with nephropathy associated with SCA and also an increasing interest in the early stages and in recognition of the associated clinical risk factors for nephropathy. The most studied markers of renal damage are microalbuminuria, proteinuria, and glomerular filtration rate (GFR). Proteinuria begins as microalbuminuria, which is an important marker of pre-clinical lesion, because it is the first marker to present altered in the presence of

glomerular injury, and may progress to macroalbuminuria (proteinuria), when the kidney has major damage resulting from sickle cell disease (AYGUN *et al* 2011, BECKER, 2011).

The GFR evaluates renal function and ischemic injury in the renal medulla may release vasodilating substances, such as prostaglandins and nitric oxide (NO), causing an increase in GFR that, when prolonged, can result in kidney damage, leading to the development of proteinuria (WIGFALL *et al*, 2000; BECKER, 2011). Elevated GFR has been observed in children from 12 months of age, being associated with age, with increased frequency until the second decade of life.

It is proposed that the hyper-hemolysis represents a new sub-phenotype of SCA and is associated with premature mortality in adults with this disease. In SCA, hemolysis varies among patients and their intensity is modulated by the presence of HbF (TAYLOR *et al.*, 2008). The hyper-hemolysis is associated with decreased bioavailability of NO, which promotes vasoconstriction, impairment of blood circulation and consequent local damage to the respective organ. The lactic dehydrogenase (LDH) is considered an useful marker of hemolysis and its levels are found very high in the presence of intravascular hemolysis. As one third of the SCA hemolysis occurs intravascularly, studies have shown that LDH can be an useful marker of complications related to hemolysis in sickle cell disease, including renal (ATAGA *et al*, 2006; GURKAN, *et al*, 2010; KATO, *et al*, 2007).

The objective of this study was to identify laboratory variable associated to renal injury in patients with SCA and to correlate serum levels of LDH with markers of injury in nephropathy in patients with sickle cell disease.

METHODS

The sample was not random, held consecutively. The cross-sectional study involved 134 patients with SCA, who attended the outpatient clinic of the University Hospital of Federal University of Sergipe, for routine visits during the period of October 2010 to June 2011. This hospital is the referral center for hemoglobinopathies in Sergipe state, and also attends patients coming from

neighboring cities. The research project was submitted and approved to the Ethics and Human Research Committee at the Federal University of Sergipe, and all patients or their guardians signed a Term of Consent. We excluded all patients who at the time of the tests revealed painful crises and suffered any systemic condition that could result in glomerulopathy not reported for SCA, such as hepatitis, lupus, inflammatory arthropathies, and HIV infection.

After followed inclusion and exclusion criteria, 10 patients were excluded: one because it was heterozygous, one held hepatopathy, one due to altered cardiac enzymes and seven because they cannot collect adequately 24 hours urine. Laboratory tests included: serum urea, creatinine, LDH and total bilirubin and fractions; hemogram, reticulocyte count, urinalysis, measurements of microalbuminuria in 24h urine, total proteinuria and urinary creatinine to determine GFR by formula clearance endogenous creatinine (Creatinine Clearance). To rule out the hypothesis of increased LDH for heart or liver problems, serum aspartate transaminase (AST), alanine transaminase (ALT), gamma-glutamyl transferase (γ GT), alkaline phosphatase, creatine kinase (CK) and creatinino fosfoquinase MB fraction (CKMB) were realized. The biochemical determinations both serum and urine were performed by dry chemistry technology in System Vitros 5.1 (Johnson's Company). According to recommendations of the *American Diabetes Association*, it was considered as normoalbuminuria, values less than or equal to 30mg/24h; microalbuminuria, values greater than 30mg/24h and less than 300 mg/24h; and macroalbuminuria, values greater than 300mg/24h. For total proteinuria were considered reference values from *Vitros System 5.1*, 42 to 225mg/24h. According to *National Kidney Foundation*, were considered as reference values for Creatinine Clearance (CrCl): women: 88-128ml/min/1,73m²; men: 97-137ml/min/1,73m²; and children: 70-140ml/min/1,73 m².

The medical records of patients were reviewed to obtain data such as hemoglobin electrophoresis, disease progression, hydroxyurea therapy, infections, cerebrovascular accident (CVA) and a history of splenectomy.

Statistical analysis

Data were collected in the appropriate form and the database entered in Excel. Numerical variables were described as mean and standard deviation (SD) or median, including minimum and maximum, to summarize the data. Exploratory data analysis was performed to investigate the distribution and the relationship between the variables. Chi square test were applied for correlation between categorical variables, Student's t test for comparison between two groups and Pearson correlation. A multiple linear regression analysis with variable selection by the "stepwise" on one side and back ward on the other, was used to obtain a parsimonious model that assessed the correlation between LDH and the independent variables. The range of 95 % was considered for acceptance of differences in statistical tests and a probability of type I error ($\alpha = 0.05$). All analyzes were performed using SPSS (v. 17, SPSS inc. Chicago).

RESULTS

The final sample consisted of 124 patients with HbSS, aged two and a maximum of 32 years, the majority was male. It was observed that majority patients were submitted to cholecystectomy, were stroke, leg ulcers and aseptic necrosis. Therapy with hydroxyurea was observed in 17.7 % of patients and hematuria was present in 4.8 % (Table1).

Table 1- Characterization of the sample according to demographic and clinical conditions of patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe.

VARIABLES	n	(%)
Age (years)	13.3 $\pm$ 6.4	
Sex M	70	56.5
W	54	43.5
Complications/medication:		
Aseptic necrosis	09	7.2
Leg Ulcers	10	8.0
Stroke	14	11.2
Splenectomy	10	8.0
Cholecystectomy	26	21.0
Calculations of the biliary tract	07	5.6
Hematuria	06	4.8
Use of hydroxyurea	22	17.7

The laboratories characteristics are shown in Table 2. No patient revealed serum urea and creatinine elevated. It was observed that 50 % of patients had serum urea under the normal range and most of them (100/124) was shown with serum creatinine levels under the normal range for age and sex. The serum bilirubin levels were elevated due to the increased levels of indirect bilirubin. Reticulocytosis was present in majority of individuals (97.3 %). The mean serum levels of total hemoglobin was found to be below the reference values and the mean serum levels of LDH values become quite elevated with an accentuated variability in patients.

Table 2- Laboratory characteristics of patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe.

VARIABLES	Mean $\pm$ SD	Range	Normal range
Urea (mg/dL)	14.4 $\pm$ 4.4	5 a 25	15 a 43
Creatinine (mg/dL)	0.36 $\pm$ 0.1	0.1 a 0.7	0.5 a 1.25
Total Bili (mg/dL)	4.45 $\pm$ 3.0	1.3 a 20.0	0.2 a 1.3
Reticulocytes (%)	6.22 $\pm$ 3.19	0.9 a 17.1	0.5 a 1.5
Hb (g/dL)	8.1 $\pm$ 1.2	5.47 a 12.2	11.1 a 16.0

LDH (U/L)	1464 $\pm$ 658.2	476 a 3723	313 a 618
AST (U/L)	55,8 $\pm$ 21,6	12 a 128	14 a 59
ALT (U/L)	32.69 $\pm$ 11.4	16 a 70	09 a 72
Platelets ($\times 10^3$)	405.9 $\pm$ 124.9	132 a 955	150 a 450

AST: Aspartate transaminase; ALT: Alanine transaminase; Hb: Hemoglobin; LDH: Lactate Dehydrogenase; Total Bili: Total Bilirubin

Albuminuria was present in 26 from 124 patients. The youngest patient with microalbuminuria was ten years old and 25 % of patients with microalbuminuria were up to 15.3 years of age. The frequency of microalbuminuria was 19.4 % (24/124) with IC 95 %, from 12.9 to 26.6. Macroalbuminuria was observed in two of 26 patients with albuminuria. The frequency of total proteinuria (urinary albumin + other proteins) was 18.5 % (23/124) with IC 95 %, from 11.3 to 26.6. To evaluate the behavior of the variables for the presence or absence of microalbuminuria, the patients were divided into two groups: one comprised patients who had elevated levels of microalbuminuria and the other comprised patients without elevation of microalbuminuria. Similarly, proceeded out in relation to the total proteinuria. The mean age was higher in patients with microalbuminuria ($p < 0.0001$), with a mean difference of 7.2 ± 1.3 years, with IC 95 %, from 4.6 to 9.8. There was no significant difference in the frequency of microalbuminuria and total proteinuria between males and females ($p = 0.10$ and $p = 0.65$). In the mean serum levels of LDH, this was shown higher in patients without microalbuminuria and in patients with total proteinuria, although this increase has not reached statistical significance. Patients with elevated levels of microalbuminuria also revealed no significant difference in mean values of CrCl, compared to those without elevation of microalbuminuria ($p = 0.82$), as were patients with or without total proteinuria ($p = 0.24$). Hemoglobin levels were more elevated in patients with elevated microalbuminuria and those with elevated proteinuria (Table 3).

Table 3- Comparison of demographic and biochemical variables of patients with sickle cell anemia with and without microalbuminuria and proteinuria treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe

VARIABLES	With Malb (n= 24)	Without Malb (n=98)	p	With Prot (n= 23)	Without Prot (n= 101)	p
Age (years)	19.0± 5,8	11.8± 5.7	<0.0001	17.5 ± 5.1	12.3 ± 5.1	<0.0001
Sex ¹ (%)						
M	10 (41.7)	59 (60.2)	0.1	12.0 (52.2)	58 (57.4)	0.65
F	14 (58.3)	39 (39.8)		11.0 (47.8)	43 (42.6)	
LDH (U/L)	1379.8 ± 646.6	1446.0 ± 614	0.64	1615 ± 812.9	1429.7 ± 620.8	0.22
CrCl (mL/24h/1,73)	164.9 ± 61.2	162.0 ± 51.9	0.82	175.9 ± 61.4	161.2 ± 52.3	0.24
Hb (g/dL)	8.7 ± 1.8	8.0 ± 1.0	0.06	8.7 ± 1.6	8.0 ± 1.1	0.02

¹ Chi square test. The other: Student's t test CrCl: Creatinine Clearance; Hb: Hemoglobin; LDH: Lactate Dehydrogenase; Malb: microalbuminúria; Prot: Proteinúria

It was observed that 11.2 % (11/98) of patients with elevated total proteinuria did not show elevation of microalbuminuria and the average age of these patients was 15.4 years with a minimum of nine years and a maximum of 26 years. From patients using hydroxyurea, 45.4% (10/22) revealed elevation of microalbuminuria and/or proteinuria.

The frequency of microalbuminuria increased with age (p <0.02). Thus, aged five to 10 years, the frequency of microalbuminuria was 7.1 %, increasing to 20 % of those aged 10-20 years. After 20 years of age, 64.3 % of patients had microalbuminuria (Figure 1).

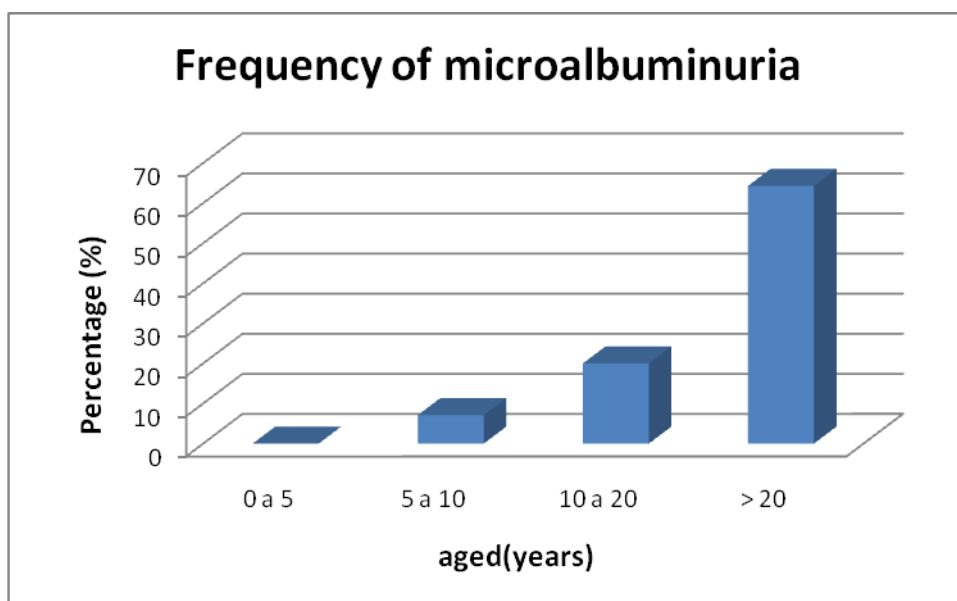


Figure1- Distribution of microalbuminuria frequency in patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe, according to age.

A large proportion of the patients showed glomerular hyperfiltration. The glomerular filtration rate was elevated in 63.7 % (79/124), an average of $194.47 \pm 42.78 \text{ mL/24h/1,73m}^2$, minimum of 140.0 and maximum of $353.0 \text{ mL/24h/1,73m}^2$, and reduced by 5.6 % (07/124) of patients, mean $81.04 \pm 6.0 \text{ mL/24h/1,73m}^2$, minimum of $73 \text{ mL/24h/1,73m}^2$ and maximum of $88.0 \text{ mL/24h/1,73m}^2$ (Figure 2).

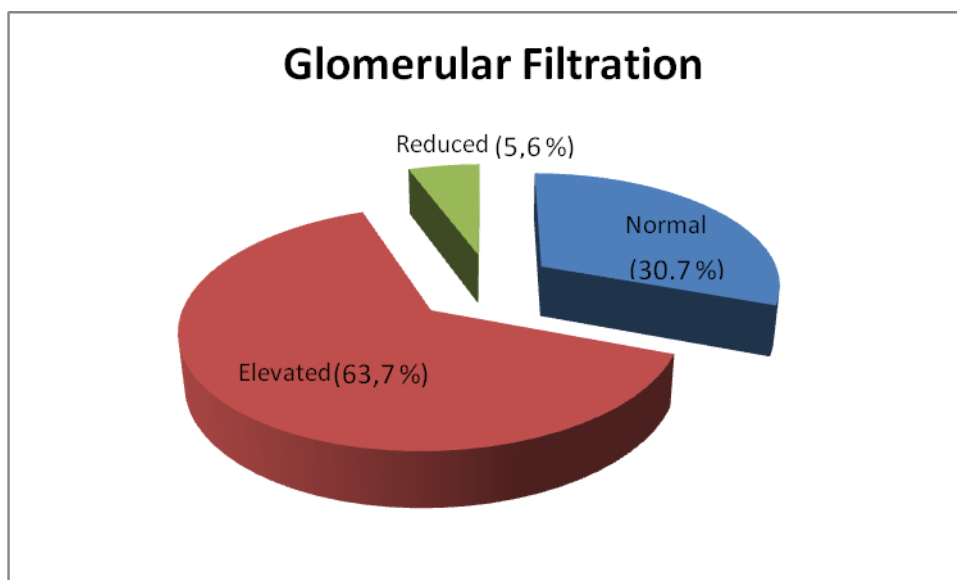


Figure 2-Frequency of glomerular filtration in patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe,

It was observed that the glomerular hyperfiltration started early. Figure 3 shows that the occurrence of hyperfiltration increases with age and, the frequency

begins to decrease after the second decade of life and increases the occurrence of reduced GFR.

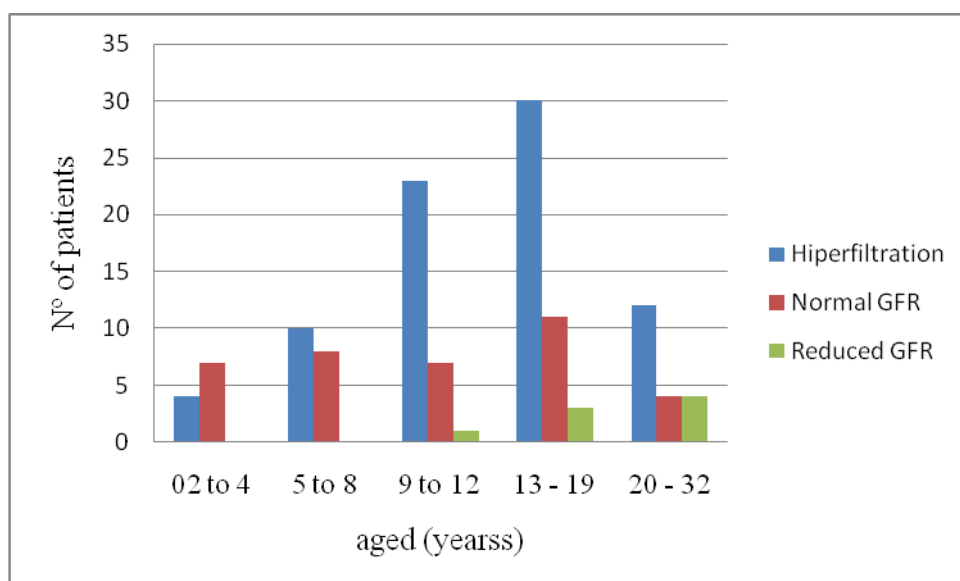


Figure 3- Distribution of Glomerular Filtration Rate (GFR) between the age groups of patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe.

The hyperfiltration was present in 70.8 % (17/24) of patients with microalbuminuria and 73.9% (17/23) of patients with total proteinuria. However, the highest frequency of hyperfiltration occurred in patients without microalbuminuria or total proteinuria (Figure 4).

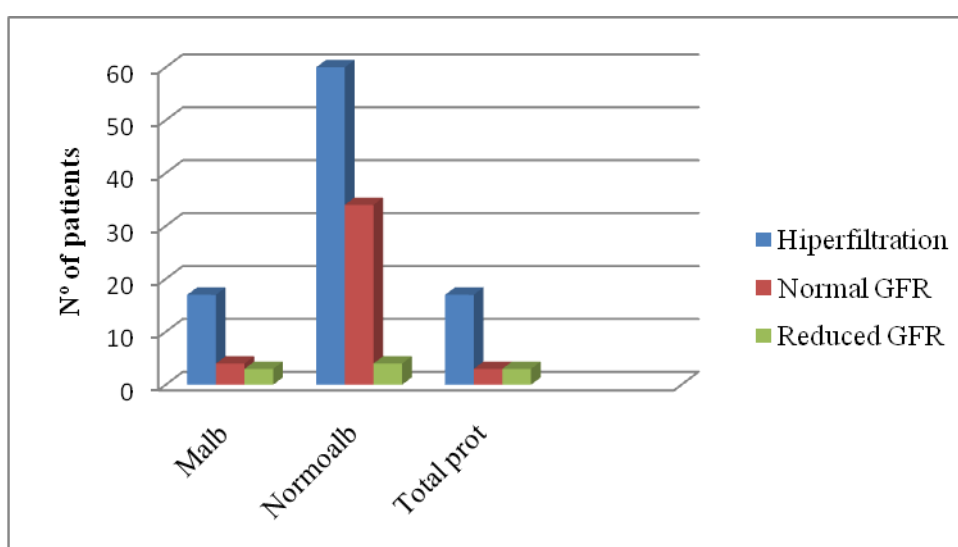


Figure 4-Distribution of patients with sickle cell anemia treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe according to Gromerular Filtration Rate (GFR) and the presence or absence of microalbuminuria (Malb) and total proteinuria (Total prot).

We carried out a correlation analysis between the various markers of renal damage and hemolysis that showed a significant moderate positive correlation between levels of LDH with proteinuria, microalbuminuria, and weakly positive with CrCl, but no significance was found. Univariate analysis also revealed a significant positive correlation with total bilirubin, indirect bilirubin, reticulocytes and a negative correlation with hemoglobin levels (Table 5).

Table 5: Correlation between markers of renal damage and hemolysis in patients with sickle cell disease treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe.

Variables	r	p
LDH x Prot	0.327	0.00002
LDH x Malb	0.294	0.001
LDH x Hb	-0.441	< 0.0001
LDH x Reticulocytes	0.289	0.02
LDH x CrCl	0.175	0.052
LDH x Bili total	0.387	< 0,0001
LDH x Bili indireta	0.395	< 0.0001
LDH x AST	0,730	< 0,0001
LDH x ALT	0,144	0,110
LDH x Leucócitos	0,390	<0,0001
Malb x CrCl	0.198	0,027
Malb x Prot	0.852	< 0.0001
Malb x Reticulocytes	0,048	0,612
Malb x Hb	0,049	0,597
Prot x CrCl	0.196	0.029
Prot x age	0.367	< 0.0001
CrCl x Creat	-0.408	< 0.0001

Pearson's correlation. LDH: lactate dehydrogenase; Prot: proteinuria; Malb: microalbuminuria, Hb: hemoglobin, CrCl : creatinine clearance, Bili: bilirubin; Creat: creatinine; AST: aspartate transaminase; ALT: alanine transaminase

Using multiple linear regression model, including independent variables, such as age, microalbuminuria, hemoglobin, reticulocytes and CrCl and LDH as the dependent variable, we found that LDH is positively associated independently with microalbuminuria, but is also associated with reticulocyte, and negatively with hemoglobin levels. The adjusted regression coefficient was 0.310, indicating that hemoglobin, reticulocytes and microalbuminuria explain 31% of the variability of LDH (Table 6).

Table 6: Multiple linear regression illustrating the variables independently associated with LDH in patients with sickle cell disease treated at the Hospital Clinic of the Federal University of Sergipe.

Variables	B	Standard error	Standardized β	P
Intercepto	2987,9	366,9	-	< 0,0001
Hemoglobin	-227,4	40.8	-0.448	< 0.0001
Microalbuminuria	1,74	0.56	0.248	0.002
Reticulocytes	44,5	17.5	0.205	0.01

Multiple linear regression. R^2 adjusted: 0.310. Dependent variable: lactate dehydrogenase. Independent variables included: age, creatinine clearance, hemoglobin, microalbuminuria e reticulocytes.

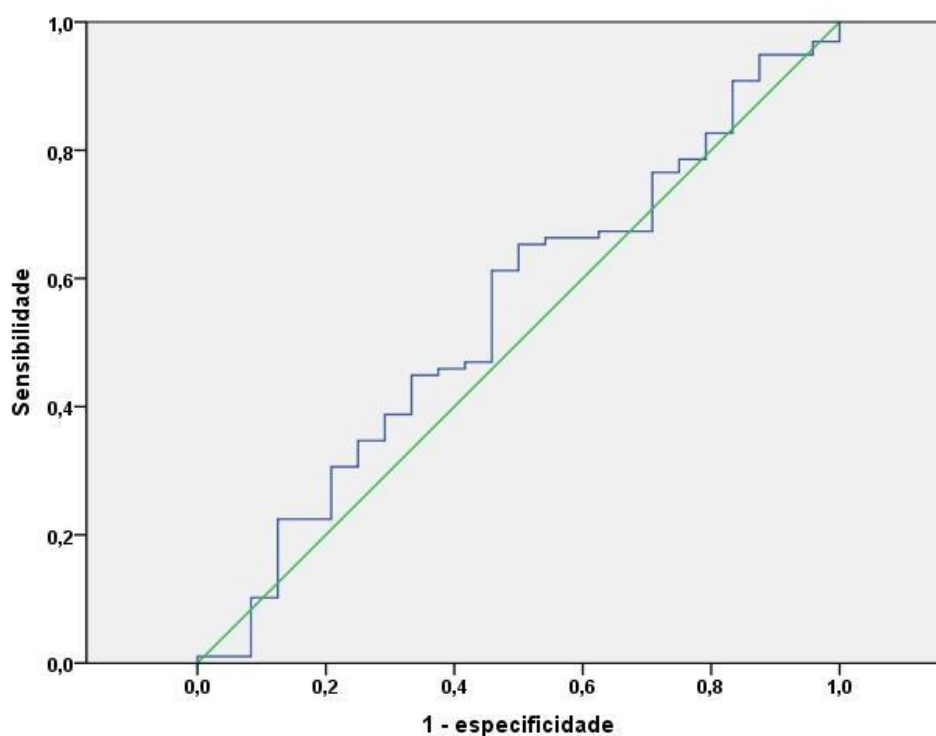


Figure 1- ROC curves showing sensitivity and specificity to discriminate microalbuminuria from the various cutoffs of LDH

The analysis of the association of microalbuminuria with the levels of LDH, using the ROC curves revealed an area under the curve 0.545 ± 0.066 with CI 0.415 to 0.675 and $p = 0.49$. So, there was not found a cutoff point for LDH to discriminate, significantly, the presence of microalbuminuria.

DISCUSSION

Studies have shown that renal complications are more common and occur at an earlier age in patients with SCA than in normal population (POWARS et al, 1991; WESSON et al, 2002). This study attempted to identify laboratory variables associated with injury of kidney, to determine the frequency of lesion markers in sickle cell nephropathy and to correlate with laboratory markers of renal injury. The frequency of microalbuminuria and proteinuria observed in the present study are in agreement with the results of other authors who reported frequency of microalbuminuria ranged from 18 to 28% in a population up to 20 years (ALVAREZ et al, 2008; DATTA et al, 2003; McKie, et al, 2007; MARSENIC et al, 2008).

The presence of microalbuminuria in young people with SCA may precede the development of macroalbuminuria (proteinuria) in adults (DHARNIDHARKA, et al, 1998; WIGFALL et al, 2000) and in this study the microalbuminuria was observed in patient from ten years of old. This early occurrence of microalbuminuria has been observed also by Alvarez et al (2008), Dharnidharka et al, (1998), Datta et al (2003) and Marsenic et al, (2008). Similar to these reports, this study showed that increasing age presented as an important factor for the occurrence of microalbuminuria and proteinuria, since the frequency of these biomarkers increased with age. The studies by Datta et al (2003) showed that patients with microalbuminuria, 14.3% had less than 9 years and this rate rose to 33.3% in patients older than 9 years of age. This relationship with age was also observed by Wigfall et al (2000) that showed the development of microalbuminuria in very young children, from 4-7 years and the microalbuminuria developed more than 10% of adolescent patients. Same, results suggesting a higher frequency of microalbuminuria with increasing age were observed by Guasch et al (2006) in a study involving 184 adult patients with HbSS, mean age 32 years (19-71 years). Those authors found a high

frequency (42%) to 26% for microalbuminuria and macroalbuminuria (proteinuria). The frequency of macroalbuminuria (proteinuria) was 20% for patients aged 18 and 30 years, but increased to 40% in patients older than 40 years.

The finding of 11.2% of patients with elevated total proteinuria without alteration of microalbuminuria indicate that other types of proteins be responsible for this increase, suggesting that there may be non-glomerular proteinuria, and kidney damage would not have been identified if only microalbuminuria had been tested. This was also observed by Alvarez *et al* (2006) found that a proportion of 14.6% of patients with elevated protein tubular in origin (β^2 microglobulin) without elevation of albuminuria, on a study with 120 sickle cell disease patients. Similar results were also reported by Marsenic *et al* (2008) found that 41% of patients with proteinuria, and of these, 61.5% had elevated total proteinuria without increased microalbuminuria. In this research were also verified the excretion of IgG and retinol binding protein, which is a marker of proximal tubular dysfunction. Those authors observed that, 16% of patients with elevated excretion of retinol binding protein, were not show increase in albuminuria. Those authors also observed that 46% of patients with high excretion of total proteinuria did not have elevation of any of the proteins tested.

The pathogenesis of sickle cell nephropathy is complex and still is not well understood. Reports in adults with SCA show that proteinuria may progress to CRF (POWARS *et al*, 1991), but it is unknown which patients with SCA will progress to CRF, being important the monitoring biomarkers of kidney injury from childhood to identify children with SCA with potential future risk of CRF. In the present study there were no measurements of other proteins in the urine, and albuminuria, because this was not the focus of research, but our data extend the results of Alvarez *et al* (2006) and Marsenic *et al* (2008) and suggest the need for further study about the occurrence of non-glomerular proteinuria in these patients, especially if one considers the young age (nine years) that there was the increase of total proteinuria. Moreover, it highlights the need for routine measurements of total proteinuria in patients with sickle cell disease to ensure early identification of kidney damage in those individuals whose microalbuminuria remains in normal range. However, because this is across-sectional study it is not possible say whether the elevated proteinuria is persistent or transient, data should be interpreted with caution.

Data from this study document a large proportion of patients with elevated GFR that begins at an early age. The measurement of glomerular filtration rate is the most widely used laboratory tests in the evaluation of renal function and high GFR is one of the first manifestations of sickle cell nephropathy being associated probably with chronic hemolysis (HAYMANN *et al*, 2010).

In this study, the frequency of hyperfiltration increased with age and showed a higher frequency at the beginning of the second decade of life. After this time the occurrence of elevated GFR began to decline and increase the frequency of GFR decreased (Figure 3). Similar results were obtained by Wigfall *et al*, (2000) and Aygun *et al*, (2011), who observed a reduction in GFR after the second decade of life. The lower levels of GFR after the second decade of life probably reflect worsening of renal filtration function, although some values of GFR in the present study, are still in the normal range or slightly elevated at this age. The low frequency of decreased GFR is due to the age of the population being of children and young adults.

The CrCl levels were correlated with microalbuminuria and proteinuria. As shown by Haymann *et al* (2010), we observed a higher proportion of patients with microalbuminuria presenting glomerular hyperfiltration, increasing the possibility that hyperfiltration can lead to glomerular injury and in time results in proteinuria. The monitoring of these patients would be important to verify that occur decline of renal function in these individuals and whether they constitute a risk group for IRC (Figure 4). The monitoring these patients in the long term would be important to detect whether there will be decline in renal function in this group of individuals.

Patients in this study had creatinine levels below the normal range. The most influential creatinine levels are BMI and glomerular filtration rate. As patients with SCA have low body weight and many have glomerular hyperfiltration, creatinine values are lower than expected and further reduced by creatinine tubular hypersecretion (BALLAS *et al*, 2009), although some patients in this study with normal BMI also had low serum creatinine. Thompson *et al* (2007) reported similar data and suggest lower reference values of creatinine for patients with SCD which would allow the recognition of earlier renal insufficiency.

Patients with SCA have hemolytic anemia and, as expected, in this study, the patients showed Hb values under the normal range and high percentage of reticulocytes (Table 2). Some authors such as Becton *et al* (2010), Gurkan *et al* (2010) and Wigfall *et al* (2000) have observed significantly lower hemoglobin levels in patients with microalbuminuria. In the sample studied, the mean hemoglobin was lower in patients without microalbuminuria and without proteinuria, but this difference was not statistically significant.

The majority of patients (95%) showed elevated serum LDH levels, with a marked and significant variation between individuals. LDH is a marker of hemolysis, which is identified as a mechanism responsible for various complications in SCA, including renal complications, due to the increase in renal blood flow, vascular occlusion and subsequent dysfunction of the respective organ involvement (KATO *et al*, 2006), being cited by some authors as a possible indicator of renal damage in these patients (GURKAN *et al*, 2010).

To answer the question of which markers of renal injury are associated with LDH, the correlation analysis between various markers of renal damage and hemolysis with this variable laboratory showed a correlation, although moderate, between the levels of LDH and microalbuminuria and proteinuria. However, univariate analysis also showed that LDH correlated with markers of hemolysis. To know which of these variables would be independently associated with LDH, the multiple linear regression model showed a association between LDH levels and microalbuminuria, but also showed that there was a negative association with levels of Hb, due to the destruction of erythrocytes. This is also evident by the positive association with reticulocytes and AST, reflecting the association with mechanisms of hemolysis. Moreover, unlike the study by Gurkan *et al* (2010) compared to the group of patients with and without microalbuminuria or total proteinuria, the difference between the LDH levels did not reach significance.

The origin of the enzyme LDH is varied, because, apart from red cells and kidney tissue, can be produced by various other tissues. The evolution of the SCA is characterized by abroad spectrum of clinical complications that affect most organs and systems (KATO *et al*, 2007; ZAGO *et al*, 2007). Thus, damage in any of the

organs and tissues that is a source of LDH, cause significant elevations in serum of this enzyme and can therefore be also responsible for alterations in levels of LDH in patients with SCA. In this addition, the association of this enzyme in the present study, with markers indicating severity of hemolytic suggests that intravascular hemolysis is the dominant source responsible for the elevated levels of LDH found in the patients studied. This assertion is supported by correlation of LDH with AST and no correlation with ALT, explained by the higher concentration of AST in erythrocytes, released during hemolysis. Similarly, analysis of the association of microalbuminuria with LDH showed that LDH levels are not able to discriminate significantly microalbuminuria. Thus, it is not possible to affirm that alterations in LDH levels are indicative of renal damage in these patients.

Studies by O'Driscoll et al (2008) and Aygun et al (2011), unlike Gurkan *et al* (2010) found no correlation between microalbuminuria and LDH. The results showed by a study conducted by Gurkan *et al* (2010) suggest that the impaired the very small number of patients studied (40 patients with three types of sickle cell disease: HbSS, HbSC, HbS β). This present study involved a greater number of individuals and all with HBSS, which is the most serious form of the disease and, therefore, presents different values and more serious for several biomarkers laboratory, however, longitudinal studies may reveal different results.

CONCLUSION

The study confirms the early occurrence of microalbuminuria, proteinuria, and glomerular hyperfiltration reported for people with SCA. The study also showed that other proteins may be responsible for proteinuria in these patients to reveal the occurrence of proteinuria without elevation of albuminuria.

It is concluded that LDH correlated with microalbuminuria, but also correlated with hemolysis markers. In addition, levels of LDH presented an accentuated variability independently of microalbuminuria and they were notable to discriminate patients with and without microalbuminuria, suggesting that the

association with renal injury is not specific as it was associated with hemolysis marker.

FINAL THOUGHTS

Suggest long-term monitoring of patients with SCA that present concomitant microalbuminuria/proteinuria with hyperfiltration to see if there will be decline in renal function in this patient population. There is also a need for further studies with LDH, including longitudinal studies, these studies that perhaps present different results for LDH, because the recognition of new biomarkers for detection of renal damage is important for the development of an accurate model of sickle cell nephropathy, with objective of early detection of subclinical lesions and patients at risk for chronic kidney disease. This would enable the introduction of more specific treatments to prevent or retard the progression of CRF.

REFERENCES

ALVAREZ, O. *et al.* Early blood transfusions protect against microalbuminúria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Blood Cancer**, USA, v.47, n.1, p.71-76, Jul. 2006.

ALVAREZ,O; LOPEZ-MITNIK G; ZILLERUELO G. Short-termfollow-up of patients with sickle cell disease and albuminuria. **Pediatr Blood Cancer**, USA, v. 50, n.6, p.1236–1239, Jun. 2008.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care. v. 4, n.1. Disponível em: <<http://www.care.diabetesjournals.org>> Acesso em: 12 jun. 2011

ATAGA, K.I.*et al.* Pulmonary hypertension in patients with sickle cell disease: A longitudinal study. **Br J Haematol**, USA, v.134, n.1, p.109-115, Jul. 2006.

AYGUN, B, *et al.* Glomerular hyperfiltration and albuminuria in children with sickle cell anemia. **Pediatr Nephrol**, USA, v.26, n.8, p.1285-1290, Aug. 2011.

BALLAS, S.K .*et al.* Definitions of the phenotypic manifestations of sickle cell disease. **Am J Hematol**, USA, v.85, n.1, p. 6-13, Jan. 2009.

BECTION, L.J. *et al.* Prevalence and clinical correlates of microalbuminúria in children with sickle cell disease. **Pediatr Nephrol**, USA, v.25, n.8, p.1505-1511, Aug. 2010.

BECKER, A.M. Sickle cell nephropathy: challenging the conventional wisdom. **Pediatr Nephrol**, USA, v.26, n.12, p.2099-2109, Dec. 2011.

DATTA, V.*et al.* Microalbuminuria as a Predictor of Early Glomerular Injury in Children with Sickle Cell Disease. **Indian Journal of Pediatrics**, Indian, v. 70, n.4, p. 307-309, Apr. 2003.

DHARNIDHARKA, V.R. *et al.* Prevalence of microalbuminúria in children with sickle cell disease. **Pediatr Nephrol**, USA, v. 12, p. 475-478, Mar. 1998.

GUASCH, A; *et al.* Glomerular Involvement In Adults With Sickle Cell Hemoglobinopathies: Prevalence And Clinical Correlates Of Progressive Renal Failure. **J Am SocNephrol**, USA, v..17, p. 2228-2235, may. 2006.

GURKAN, S.*et al.* Lactate Dehydrogenase as a predictor of kidney involvement in patients with sickle cell anemia. **Pediatric Nephrology**, USA, v. 25, n.10, p. 2123-2127, Oct. 2010.

HAYMANN, J.P. *et al.* Glomerular Hyperfiltration in Adult Sickle Cell Anemia: a frequent hemolysis associated feature. **Clin J Am SocNephrol**, USA, v.5, n.5, p.756-761, May.2010.

KATO, G.J. *et al.* Lactate dehydrogenase as a biomarker of hemolysis-associated nitric oxide resistance, priapism, leg ulceration, pulmonary hypertension, and death in patients with sickle cell disease. **Blood**, USA, v.107, n.6, p. 2279-2285, Mar. 2006.

KATO, G.J; GLADWIN, M.T; STEINBERG, M.H. Deconstructing sickle cell disease: Reappraisal of the role of hemolysis in the development of clinical sub-phenotypes. **Blood Reviews**, USA, v.21, n.1, p. 37-47, Jan. 2007.

MARSENIC, O; COULOURES, K.G; WILEY, J.M. Proteinuria in children with sickle cell disease. **Nephrol Dial Transplant**, USA, v.23, n.2, p. 715–720, Feb. 2008.

MCKIE K. T.*et al.* Prevalence, prevention and treatment of microalbuminuria and proteinuria in children with sickle cell disease. **J Pediatr Hematol Oncol**, USA, v.29, n.3, p.140–144, Mar. 2007.

MOTA, V.T. **Bioquímica Clínica: Princípios e Interpretações**. 5ª ed. São Paulo: Medbook, 2009. v. 9, p. 99- 110.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION – KidneyDisease: OutcomesQualityInitiative (K/DOQI) Disponível em: <www.kdigo.org/guidelinescompare/kdoqi> Acesso em: 15 mai. 2011.

O'DRISCOLL, S. *et al.* Serum lactate dehydrogenase activity as a biomarker in children with sickle cell disease. **Br J Haematol**, USA, v.140, n.2, p. 206-209, Jan. 2008.

PLATT, O.S.*et al.* Mortality in sickle cell disease- Life Expectancy and Risk Factors for Early Death. **N Engl J Med**, USA, v. 330, n. 23, p. 1639-1644, jun. 1994.

POWARS, D.R. *et al.* Chronic renal failure in sickle cell disease: risk factors, clinical course, and mortality. **Ann Intern Med**, USA, v.115, n.8, p.614-620, Oct. 1991.

POWARS, D.R *et al.* Outcomes of sickle cell anemia: a 4-decade observational study of 1056 patients. **Med Baltim**, USA, v.84, n.6, p.363-376, Nov. 2005.

PRABHAKAR, H; HAYWOOD Jr, C; MOLOKIE, R. Sickle disease in the United States: Looking back and forward at 100 years of progress in management and survival. **Am. J. Hematol.** USA, v. 85, n. 5, p. 346-353, May. 2010.

TAYLOR, J.G. *et al.* Chronic hyper-hemolysis in sickle cell anemia: association of vascular complications and mortality with less frequent vaso-occlusive pain. **PLoS One**, USA, v.3, n.5, p.e2095, May. 2008.

THOMPSON, J. *et al.* Albuminuria and Renal Function in Homozygous Sickle Cell Disease. Observations From a Cohort Study. **Arch Intern Med**, USA, v.167, n.7, p.701-708, Apr. 2007.

WESSON, D.E. The initiation and progression of sickle cell nephropathy. **Kidney Int.** USA, v.61, n.6, p. 2277-2286, Jun. 2002.

WHO- WORLD HEALTH ORGANIZATION.2011. Disponível em <http://www.who.int/genomics/public/geneticdisease>> Acesso em: 05 jun. 2011.

WIGFALL, D.R et al.Prevalence and clinical correlates of glomerulopathy in children with sickle cell disease. **J. Pediatr**, USA, v.136, n.6, p. 749-753, Jan. 2000.

ZAGO, M.A; SILVA PINTO, A.C. Fisiopatologia das doenças falciformes: da mutação genética à insuficiência de múltiplos órgãos. **Rev. bras. hematol. hemoter.** Brasil, v.29, n.3, p. 207-214, Jul. 2007.

