

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS E
TOXICOLÓGICAS**

FLÁVIA CRISTINA GARCIA SILVA

**POLIMORFISMO INSERÇÃO/DELEÇÃO NO GENE DA ENZIMA CONVERSORA
DE ANGIOTENSINA ASSOCIADO À INTERLEUCINA 1 BETA, À CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DO PLASMA E À FUNÇÃO RENAL**

BELO HORIZONTE

2019

FLÁVIA CRISTINA GARCIA SILVA

**POLIMORFISMO INSERÇÃO/DELEÇÃO NO GENE DA ENZIMA CONVERSORA
DE ANGIOTENSINA ASSOCIADO À INTERLEUCINA 1 BETA, À CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DO PLASMA E À FUNÇÃO RENAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Lucas Mota – UFMG

BELO HORIZONTE

2019



FOLHA DE APROVAÇÃO

Polimorfismo inserção/deleção no gene da enzima conversora de angiotensina associado à Interleucina 1 Beta, à capacidade antioxidante do plasma e à função renal

FLÁVIA CRISTINA GARCIA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 10 de julho de 2019, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Ana Paula Lucas Mota - Orientadora
UFMG

Profa. Daniela Almeida Freitas Afonso
Centro Universitário UNI-BH

Profa. Rita Carolina Figueiredo Duarte
UFMG

Belo Horizonte, 10 de julho de 2019.

S586p Silva, Flávia Cristina Garcia.
Polimorfismo inserção/deleção no gene da enzima conversora de angiotensina associado à interleucina 1 beta, à capacidade antioxidante do plasma e à função renal / Flávia Cristina Garcia Silva.
– 2019.
104 f. : il.

Orientadora: Ana Paula Lucas Mota.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Inflamação - Teses. 2. Polimorfismo (Genética) - Teses. 3. Rins - Transplantes - Teses. 4. Enzima conversora da angiotensina - Teses.
I. Mota, Ana Paula Lucas. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.0473

Dedico este trabalho a minha avó, Iolanda Garcia Rodrigues, fonte inesgotável de inspiração para este trabalho, vislumbrando sempre uma vida melhor para os pacientes diabéticos e renais. E ao meu tio José Geraldo, ente querido que se foi recentemente devido a uma grave doença renal.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus e a Nossa Senhora Aparecida que me livram de todo mal, me protegem, iluminam e dão forças, sempre, para seguir em frente.

À minha orientadora, professora Ana Paula Lucas Mota, que desde a graduação me inspira a ser uma profissional melhor e capacitada, por me ajudar a concretizar este objetivo com suas orientações e sabedoria.

Aos colegas do laboratório de Bioquímica e Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela convivência e amizade. Em especial a Lorraine e Pâmela por toda ajuda durante o projeto, muito gratidão a vocês!!

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas pelos ensinamentos. Em especial à professora Karina Braga, que gentilmente permitiu que eu lecionasse em uma de suas turmas.

Aos meus amados pais, Eliana e Hermínio, que mesmo na distância física nunca deixaram de participar e contribuir para as minhas conquistas. Agradeço as orações, o apoio e o amor incondicional que sempre devotam a mim e minhas irmãs. Vocês serão sempre a minha grande inspiração de vida! Devo a vocês tudo que me tornei. Minha gratidão eterna.

Ao meu esposo, Alysson Costa, por todo amor, por segurar a minha mão em dias difíceis, por sempre acreditar em mim e me fazer ir mais longe. O sonho que se sonha junto torna-se realidade!

Ao meu amado filho, Henrique. Fonte de doçura e amor incondicional. Razão de toda força interior, de todo desejo de boas conquistas. Filho, um dia você saberá como você foi importante para esta conquista, quando aos quatro meses de nascido, você deitado no sofá via a mamãe estudar dia e noite, após 10 anos de formada, para poder realizar um sonho antigo dela. Você, naquele momento, e para sempre, será a minha força!

Às minhas irmãs, Samantha e Fernanda, por todo apoio, pelas risadas, pelo incentivo durante a vida, por serem na terra um pedacinho de mim.

Ao meu avô Francisco, Fazico, e minha avó Divina por olharem por mim do céu, abençoando meu trajeto nesta vida.

À minha rede de apoio, Samantha, Maria Eduarda e toda família, por cuidarem da minha jóia mais preciosa enquanto eu dava aulas, fazia pesquisas e me dedicava este trabalho.

À Unimed-BH por me propiciar a dar continuidade neste objetivo.

“Os métodos atuais de estudo da função renal podem ser muito elaborados para aplicação clínica geral, mas nenhum método deve ser desprezado se puder ajudar significativamente na decisão do assunto entre a vida e a morte”

Homer Smith

Colaboradores

- Dr. Fernando das Mêrces de Lucas Júnior – Médico Nefrologista do Hospital das Clínicas da UFMG.
- Ms. Lorraine Vieira Alves – Mestra do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Dra. Rita Carolina Figueiredo Duarte – Pós-doutoranda do programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.
- Pâmela Santos Azevedo - Aluna de Iniciação Científica do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia UFMG.

Instituições Participantes

- Ambulatório Bias Fortes, Hospital das Clínicas da UFMG.
- Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG

Apoio Financeiro

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq

RESUMO

O transplante renal se apresenta como a melhor escolha terapêutica para o paciente com doença renal crônica terminal, trazendo melhoria na qualidade de vida desses pacientes. A enzima conversora de angiotensina (ECA) desempenha um papel crucial na fisiologia renal. O polimorfismo inserção/deleção (I/D) no gene *ECA*, determina a variação plasmática da ECA e, por consequência, afetam os rins e o transplante renal. Este estudo avaliou a associação dos marcadores inflamatórios, interleucina 1 beta (IL-1 β) e da capacidade antioxidante com o polimorfismo I/D no gene da ECA frente à função renal pós-transplante e à presença de rejeição. Foram selecionados 173 pacientes transplantados renais, sendo distribuídos em grupos de acordo com o nível de creatinina (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL); de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) (R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m² e R2: eRFG < 60 mL/min/1,73m²); a presença de história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ: sem episódio de rejeição; REJ: rejeição prévia; INDET: rejeição indeterminada) e o tempo pós transplante, ou seja, o período entre a realização da cirurgia e a data da coleta sanguínea dos pacientes (T1: 01 a 24 meses ; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: > 120 meses pós transplante). Para detecção dos polimorfismos foi utilizada a reação em cadeia da polimerase, para a IL-1 β o ensaio imunoenzimático Multiplex e para determinação do perfil de oxidação foi utilizado o método colorimétrico de redução do MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5-difenil brometo de tetrazolina)]. O estudo demonstrou uma correlação positiva entre os níveis de creatinina e o perfil de estresse oxidativo, eRFG e o tempo pós-transplante, bem como uma correlação negativa entre o ensaio de MTT eRFG. Menores níveis da IL-1 foram relacionados com o grupo de maior tempo pós-transplante. Pacientes que não utilizam os inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) demonstraram um maior índice de capacidade antioxidante. Cumpre ressaltar que este estudo faz parte de um projeto que elencou outros biomarcadores relacionados ao transplante renal e todos eles serão correlacionados posteriormente. Diante de tais resultados e das limitações do estudo, novas pesquisas precisam ser realizadas a fim de demonstrar se os biomarcadores avaliados poderiam ser utilizados no monitoramento da função renal e do enxerto após o transplante renal.

Palavras-chave: Transplante renal. Polimorfismos. Enzima conversora da angiotensina. Inflamação.

ABSTRACT

Renal transplantation presents as the best therapeutic choice for the patient with terminal chronic renal disease, bringing improvement in the quality of life of these patients. Angiotensin converting enzyme (ACE) plays a crucial role in renal physiology. The insertion / deletion (I / D) polymorphism in the ACE gene determines the plasma variation of ACE and, consequently, affects the kidneys and renal transplantation. This study evaluated the association of inflammatory markers, interleukin 1 beta (IL-1 β) and antioxidant capacity with the I / D polymorphism in the ACE gene against renal transplant function and the presence of rejection. A total of 173 kidney transplant recipients were selected and were divided into groups according to the creatinine level (C1: creatinine \leq 1.4 mg / dL and C2: creatinine $>$ 1.4 mg / dL); according to the estimated glomerular filtration rate (eRFG) (R1: eRFG \geq 60 mL / min / 1.73m² and R2: eRFG $<$ 60 mL / min / 1.73m²); the presence of a previous history of graft rejection (no REJ: no rejection episode, REJ: prior rejection, INDET: undetermined rejection), and the time after transplantation, ie the time between surgery and the date of blood collection. (T1: 01 to 24 months, T2: 25 to 60 months, T3: 61 to 120 months, T4: $>$ 120 months after transplantation). Polymerase chain reaction was used for the detection of polymorphisms, the Multiplex immunoenzymatic assay was used for IL-1 β and for oxidation profile determination the colorimetric method of reducing MTT [(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazoline bromide)]. The study demonstrated a positive correlation between creatinine levels and oxidative stress profile, eRFG and post-transplant time, as well as a negative correlation between the MTT eRFG assay. Lower IL-1 levels were related to the longer post-transplant group. Patients who did not use angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEI) demonstrated a higher index of antioxidant capacity profile. It should be noted that this study is part of a project that listed other biomarkers related to kidney transplantation and all of them will be correlated later. In view of these results and the limitations of the study, further research needs to be done to demonstrate whether the biomarkers evaluated could be used to monitor renal and graft function after renal transplantation.

Keywords: Renal transplant. Polymorphisms. Angiotensin converting enzyme. Inflammation.

LISTA DE FIGURAS

1 Localização Citogenética: 17q23.3 do polimorfismo I/D do gene ECA.	36
2 Delineamento experimental	45
3 Níveis séricos de IL 1 em diferentes grupos de pacientes transplantados renais.....	36
4 Níveis séricos de IL 1 distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante Pacientes distribuídos em função do tempo pós transplante (T1: 01 a 24 meses ; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: >120 meses pós transplante).....	36
5 Níveis séricos de interleucina 1 distribuídos em grupos de acordo com o genótipo (DD, ID e II).	36
6 Níveis séricos do perfil de oxidação do plasma em diferentes grupos de pacientes transplantados renais.....	36
7 Níveis séricos do perfil de antioxidação do plasma distribuidos em grupos de acordo com o genótipo (DD, ID e II)	36

LISTA DE TABELAS

1 Caracterização clínica e demográfica da população estudada	52
2 Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina.....	54
3 Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado.	55
4 Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto.....	55
5 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina.....	56
6 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado.....	56
7 Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com a rejeição prévia ao enxerto	57
8 Avaliação do polimorfismo I/D da ECA em função da presença ou ausência da doença hipertensiva pós-transplante.....	57
9 Frequências genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com tipo de medicação imunossupressora.....	58
10 Análise das drogas anti-hipertensivas em receptores do transplante renal	58

11 Análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos receptores do transplante renal

.....58

LISTA DE QUADROS

1 Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil em 2018	236
2 Estágios do ritmo de filtração glomerular na doença renal crônica	36
3 Classificação da pressão arterial de acordo com a medição casual ou no consultório a partir de 18 anos de idade	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	Associação Brasileira de Transplante de Órgãos
AGT	angiotensinogênio
ANG I	angiotensina I
ANG II	angiotensina II
ARA	antagonistas dos receptores de angiotensina
Anti-AT1	anticorpos dos receptores tipo 1 da angiotensina II
AT1	receptores de angiotensina do tipo I
AT2	receptores de angiotensina do tipo II
BRA	bloqueador do receptor de angiotensina
CKD-EPI	colaboração epidemiológica da doença renal crônica (em inglês, <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration</i>)
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais
CSA	ciclosporina
CNI	inibidor da calcineurina
DM	diabetes mellitus
DNA	ácido desoxirribonucleico (em inglês, <i>deoxyribonucleic acid</i>)

DRC	doença renal crônica
ECA	enzima conversora de angiotensina
ELISA	ensaio imunoenzimático (em inglês, <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
eRFG	ritmo de filtração glomerular estimado
EROs	espécies reativas de oxigênio (em inglês, <i>reactive oxygen species</i>)
HA	hipertensão arterial
HbA1c	hemoglobina glicada
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HLA	antígeno leucocitário humano (em inglês, <i>human leukocyte antigen</i>)
I/D	Inserção/Deleção
IECA	inibidores da enzima conversora de angiotensina
IL	interleucina
IL-1 β	interleucina 1 beta
ITU	infecção do trato urinário
MDRD	modificação da dieta na doença renal (em inglês, <i>modification of diet in renal disease</i>)

MHC	complexo principal de histocompatibilidade (em inglês, <i>major histocompatibility complex</i>)
MMF	micofenolato mofetil
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
PA	pressão arterial
PAD	pressão arterial diastólica
PAS	pressão arterial sistólica
PCR	reação em cadeia da polimerase (em inglês, <i>polymerase chain reaction</i>)
PDN	prednisona
REN	renina
RBT	Registro Brasileiro de Transplantes
RPM	rotação por minuto
SBN	Sociedade Brasileira de Nefrologia
SBC	Sociedade Brasileira de Cardiologia
SNC	Sistema nervoso central
SNPs	polimorfismos de nucleotídeo único (em inglês, <i>single nucleotide polymorphism</i>)
SRA	sistema renina angiotensina

TAC tacrolimus

TNF fator de necroso tumoral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1 TRANSPLANTE RENAL	23
2.1.1 Epidemiologia do transplante renal	23
2.1.2 Doença Crônica Renal e o transplante renal	24
2.1.3 Resposta imunológica no transplante renal	27
2.2 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO TRANSPLANTE RENAL.....	29
2.2.1 A hipertensão arterial no transplante renal	32
2.3 POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E SUA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DO TRANSPLANTE RENAL	35
2.4 INTERLEUCINA-1 β E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA.....	38
3 JUSTIFICATIVA	43
4 OBJETIVOS	44
4.1 OBJETIVO GERAL	44
4.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	44
5 MATERIAIS E MÉTODOS	45
5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ASPECTOS ÉTICOS.....	45
5.2 CASUÍSTICA	46
5.2.1 Critérios de inclusão	47
5.2.2 Critérios de não inclusão ou exclusão	48
5.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS	48
5.3.1 Preparo das amostras biológicas	48
5.4 MÉTODOS	49
5.4.1 Determinação do polimorfismo I/D no gene da ECA	49
5.4.1.1 Extração de DNA	49
5.4.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	49
5.4.2 Determinação do perfil oxidante do plasma	50
5.4.2.1 Ensaio de redução do MTT	50

5.4.3 Determinação da Interleucina 1 beta (IL-1β)	50
5.4.4 Análises Estatísticas	51
6 RESULTADOS	52
6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO	52
6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ECA EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL	54
6.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA 1 EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	58
6.3.1 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função da creatinina sérica, do eRFG , da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante.	59
6.3.2 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função dos polimorfismos da ECA	61
6.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDANTE DO PLASMA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	62
6.4.1 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função da creatinina sérica, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante	62
6.4.2 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função dos polimorfismos de ECA	63
6.5 AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	64
6.5.1 Avaliação das drogas anti-hipertensivas (IECA e não IECA) em função da interleucina-1 e o perfil de oxidação do plasma	64
6.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS	65
7 DISCUSSÃO	66
7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO	66
7.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ECA EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL	69

7.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA 1 EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	71
7.3.1 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função da creatinina sérica, do eRFG , da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante.	71
7.3.2 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função dos polimorfismos da ECA	73
7.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL OXIDANTE DO PLASMA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS	75
7.4.1 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função da creatinina sérica, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante	75
7.4.2 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função dos polimorfismos de ECA	76
7.5 AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS.....	77
7.5.1 Avaliação das drogas anti-hipertensivas (IECA e não IECA) em função da interleucina-1 e o perfil de oxidação do plasma.....	77
7.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS	78
8 CONCLUSÕES	79
9 PERSPECTIVAS DO ESTUDO	80
REFERÊNCIAS	81
ANEXO A	97
ANEXO B	98
APENDICE A	99
APENDICE B.....	102
APENDICE C.....	103
APENDICE D.....	104

1 INTRODUÇÃO

O transplante renal se apresenta como a melhor alternativa de tratamento para os pacientes com doenças renais crônicas terminais, melhorando a qualidade e aumentando a expectativa de vida dos pacientes e a sobrevida do enxerto, além de reduzir custos para o sistema de saúde. Ao longo dos anos o transplante renal evoluiu consideravelmente com vários marcos importantes associados às técnicas cirúrgicas, imunologia, expansão de fonte de doadores, preservação do órgão, pesquisa sobre indução de tolerância e evolução das drogas imunossupressoras (CALLAGHAN; BRADLEY, 2006; SHRESTHA; HAYLOR; RAFTERY, 2015; AZARFAR, 2018).

Ao longo dos anos, melhorias na terapia imunossupressora resultaram na diminuição da rejeição aguda, aumentando assim a expectativa de vida do enxerto, permanecendo o desafio da perda tardia do enxerto como um grande desafio para as equipes de transplante, bem como o monitoramento da evolução do transplante renal através de exames que auxiliem no diagnóstico e monitoramento (MEIER-KRIESCHE et al., 2004).

O padrão ouro para avaliação do transplante renal continua sendo a biópsia, mas ela apresenta uma série de desvantagens, já que é altamente invasiva e sujeita a complicações (MHAMEDI et al., 2018).

Claramente, se faz necessário a utilização de novos biomarcadores não invasivos e com melhor valor preditivo para serem utilizados no diagnóstico e monitoramento em série do transplante renal, além do benefício de poderem contribuir para a mudança da terapia em um estágio precoce antes que danos significativos ao enxerto tenha ocorrido, trazendo assim a possibilidade de individualizar e personalizar o tratamento (SALVADORI; TSALOUCHOS, 2017).

O avanço da ciência e das técnicas de biologia molecular possibilitaram o advento de novos biomarcadores, estando entre as aplicações mais promissoras, as análises de genes candidatos e seus polimorfismos por proporcionarem uma melhor acurácia diagnóstica, levando a uma melhor compreensão dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos no transplante renal, com identificação de fatores genéticos determinantes de suscetibilidade às doenças renais, progressão da lesão ou proteção renal, bem como dos processos imunológicos e/ou inflamatórios relacionados (CHOWDHURY; HERNANDEZ-FUENTES, 2013; MOECKLI et al., 2019).

Os fatores genéticos assumem um papel modulador no desenvolvimento das doenças renais do que propriamente determinantes no aparecimento destas doenças. Um exemplo é o polimorfismo I/D no gene da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é a principal enzima que influencia toda a atividade do sistema renina angiotensina (SRA), sendo o polimorfismo I/D da ECA uma variação genética comum desse gene. A ECA converte a angiotensina I (ANG I) em angiotensina II (ANG II), e, portanto, qualquer alteração genética nessa conversão resultará em uma superativação do SRA, com alta liberação de ANG II, e por consequência o aumento da pressão arterial (PA). Todos estes mecanismos estão diretamente associados a função renal deficiente do transplante e a baixa sobrevida do enxerto (HUANG et al., 2015).

Outros biomarcadores importantes que podem contribuir para a avaliação da evolução do transplante, são as respostas imunes dependentes e independentes de aloantígenos que são mediadas por citocinas, mediadores importantes para o desfecho do enxerto renal. O transplante renal é um processo indutor de intensa reação inflamatória e as citocinas/interleucinas estão sabidamente relacionadas com os mecanismos imunoinflamatórios do transplante renal (SOARES; SANTOS, 2017).

A IL-1 β , um importante citocina pró-inflamatória, desempenha papel importante nas doenças inflamatórias e imunomediadas, muitas delas relacionadas às doenças renais, tendo um valor preditivo durante a rejeição do enxerto do transplante renal, precedendo a disfunção e lesão do enxerto (BHAT, 2017).

Mecanismos associados com a estimulação do SRA e a inflamação, tem sido proposto, uma vez que facilitam a progressão da hipertensão. A ANG II além do aumento da PA por vasoconstrição, quando cronicamente elevada, estimula vários mecanismos fisiopatológicos como aumento capacidade antioxidante e ativação do sistema imune. As citocinas pró-inflamatórias, por sua vez, regulam componentes do SRA, acelerando ainda mais a formação de ANGII, formando assim um ciclo que se retroalimenta (SATOU et al., 2018).

Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar o polimorfismo inserção/deleção (I/D) do gene *ECA*, o marcador plasmático inflamatório, IL-1, a capacidade antioxidante do plasma, em receptores do transplante renal, correlacionando estes dados à função renal, do enxerto e à história prévia de rejeição.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 TRANSPLANTE RENAL

2.1.1 Epidemiologia do transplante renal

O transplante de órgãos é um procedimento amplamente realizado em todo o mundo. A técnica consiste em transferir um órgão ou tecido saudável de um doador (falecido ou vivo) para um receptor doente, através de um procedimento cirúrgico. O transplante renal é considerado a mais completa alternativa de substituição da função renal, sendo realizado através da implantação de um rim sadio em pacientes acometidos por doenças renais, melhorando assim a qualidade de vida, com menor mortalidade destes pacientes e aumento da sobrevida (ABTO, 2018; COZZI; COLPO; SIVESTRO, 2017).

Atualmente, o Brasil é referência mundial na área de transplantes e possui o maior sistema público de transplantes do mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019), sendo o segundo em número absoluto de transplantes. Segundo a Associação Brasileira de Transplantes de Órgãos (ABTO) no Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) durante todo o ano de 2018 foram realizados 8.692 transplantes de órgãos sólidos, sendo 5.923 transplantes renais, representando 67,88% dos transplantes realizados no Brasil neste período. A maior parte dos transplantes realizados no Brasil foi proveniente de doadores falecidos, totalizando 4.905 (**Quadro 1**) (ABTO, 2018).

Quadro 1 – Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil em 2018.

Órgãos	Total	Doador Vivo	Doador Falecido
Coração	353		353
Fígado	2.182	166	2.016
Pâncreas	9		9
Pâncreas/Rim	104		104
Pulmão	121	2	119
Rim	5.923	1.018	4.905
Total	8.692	1.186	7.506

Fonte: ABTO, 2018 (modificado)

Segundo o Censo Brasileiro de Diálise realizado pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), o número total de pacientes com doença renal crônica (DRC) em

tratamento dialítico em 2016, foi de 122.825. As causas primárias da doença renal mais frequentemente relatadas em 2016 foram a hipertensão arterial (HA) (34%) e o diabetes mellitus (DM) (30%), seguidos por glomerulonefrite crônica (9%) e rins policísticos (4%), ficando indefinidas em 11% dos casos. DM e HA correspondem a 64% dos casos de pacientes em diálise (SESSO et al., 2016).

No Brasil o primeiro transplante renal foi realizado em 1965, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (SBN, 2016). Desde então a evolução dos processos relacionados ao transplante é contínua. As técnicas cirúrgicas do transplante evoluíram consideravelmente, iniciando com técnicas vasculares abertas no início do século XX, chegando aos dias atuais com técnicas robóticas minimamente invasivas (TERRITO et al., 2017). Associado aos avanços das técnicas cirúrgicas cabe destacar o avanço do manejo imunológico dos pacientes transplantados renais, partindo dos experimentos realizados em animais, com avaliações histológicas e celulares, chegando ao nível molecular com o uso de tecnologia avançada (SA, LEAL, ROSA, 2016). O advento das drogas imunossupressoras também contribuiu para a evolução do transplante trazendo uma maior sobrevida aos pacientes transplantados (LIM; KOHLI; BLOOM, 2017).

2.1.2 Doença Renal Crônica e transplante renal

A doença renal crônica (DRC) é a principal patologia que leva ao transplante renal. Apresenta características clínicas e morfológicas bastante heterogêneas, sendo o diabetes mellitus (DM), hipertensão arterial (HA), infecções, tumores renais e as glomerulopatias uma das principais causas de DRC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

A DRC pode evoluir chegando à fase de doença renal crônica terminal, levando o paciente à necessidade de transplante. Os avanços tecnológicos e medicamentosos vêm ajudando a suportar o transplante renal que é realizado na tentativa de compensar ou substituir funções glomerulares e tubulares perdidas pelos rins de forma progressiva e irreversível (BRASIL, 2014).

Algumas doenças que levam à DRC acometem áreas específicas dos rins, como as glomerulopatias, que afetam os glomérulos renais com diminuição do ritmo de filtração glomerular estimado (eRFG) e maior permeabilidade glomerular, sendo geralmente de origem imunológica como na síndrome nefrótica e na nefrite lúpica.

Algumas condições genéticas levam a alterações no desenvolvimento dos túbulos, como a doença renal policística, ou em condições adquiridas como na exposição a medicamentos nefrotóxicos que podem causar alterações tubulares. Outras condições relacionadas a infecções e tumores renais, bem como às doenças sistêmicas como HA e a DM estão relacionadas como causas primárias da DRC (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

Uma vez descoberta a DRC, o grau de disfunção e a progressão da doença devem ser monitorados por diversos biomarcadores, dentre eles destaca-se o eRFG, sendo considerado essencial para a prática clínica e para detecção e monitoramento da DRC (LEVEY; INKER; CORESH, 2014), bem como a creatinina, uréia, albumunúria, cistatina C e urina rotina. Considera-se como fator de diagnóstico para DRC um eRFG entre os estágios 3 e 5, sendo um valor $<60 \text{ mL/min/1.73m}^2$ em um período de três meses consecutivos indicativo de DRC (KIRSZTAJN et al., 2013), conforme o **Quadro 2**.

Quadro 2- Estágios do Ritmo de Filtração Glomerular na Doença Renal Crônica

Estágio do eRFG	eRFG (mL/min/1.73m²)	Termos
Estágio 1	≥ 90	Normal ou alto
Estágio 2	60-89	Levemente diminuído
Estágio 3 a	45-59	Leve a moderadamente diminuído
Estágio 3 b	30-44	Moderada a extremamente diminuído
Estágio 4	15-29	Extremamente diminuído
Estágio 5	< 15	Doença renal terminal

Fonte: KIRSZTAJN , 2013 (modificado)

A filtração glomerular é um processo essencial para a função homeostática renal e produção de urina, ocorre à medida que o sangue flui pelos capilares glomerulares e é formado um ultrafiltrado dependente de uma adequada perfusão renal, esta se encontra alterada nas doenças renais, com características de hipoperfusão. Características intra e inter-individuais, grupos étnicos e uma série de

condições fisiopatológicas causam variabilidade no eRFG e, especificamente, nos pacientes renais observa-se um declínio no número de néfrons (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; LEVEY; INKER; CORESH, 2014).

O RFG medido com um marcador de filtração exógeno é mais preciso, sendo considerada padrão ouro a mensuração da depuração de inulina urinária, marcador de filtração exógena ideal, mas que ainda continua sendo pouco utilizada diante de seu alto custo (KAKUTA et al., 2019).

Diante disso outros marcadores séricos e de depuração de substâncias endógenas, com melhor custo benefício são utilizados, já que o eRFG não pode ser medido de maneira direta. O marcador endógeno mais utilizado para estimar o eRFG é a creatinina, excretada em grande parte pela filtração glomerular, porém sofre interferências de uma variedade de fatores independentes do eRFG (MOMBELLI et al., 2016).

Todas as fórmulas de cálculo do eRFG utilizadas avaliam em diferentes graus fatores que influenciam a creatinina, como idade, sexo, etnia e peso. A relação entre a creatinina plasmática e o eRFG é inversa, sendo a relação contemplada em quase todas as fórmulas de cálculo do eRFG (MAILLARD; DELANAYE; MARIAT, 2015).

Ao longo das últimas duas décadas os cálculos utilizados para estimar o eRFG progrediram, com fórmulas baseadas na creatinina sérica, sendo as mais utilizadas na prática clínica o *Modification of Diet in Renal Disease* (MDRD) e *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD - EPI), seguindo as equações (SBPC, 2015):

Fórmula MDRD 4v com um fator de correção “186” (4):

$e\text{TGF (mL/min/1,73m}^2) = 186 \times (\text{creatinina sérica})^{-1,154} \times (\text{idade})^{-0,203} \times (0,742 \text{ se mulher}) \times (1,212, \text{ se indivíduo dos EUA de origem africana, considerado como raça negra em outras localidades}).$

Fórmula para CKD-EPI:

$e\text{RFG} = 141 \times \min(\text{Cre/k}, 1)^\alpha \times \max(\text{Cre/k}, 1)^{-1,209} \times 0,993^{\text{idade}} \times 1,1018 [\text{se mulher}] \times 1,159 [\text{se negro}]$

A equação do MDRD data de 1999, sendo revisto em 2000 e 2006, e foi desenvolvido para avaliar se a restrição proteica na dieta estava associada a uma PA mais baixa em pacientes com DRC. Em sua versão original a equação considerava seis variáveis, dentre elas a determinação de albumina e ureia séricas. Na revisão de

2000 passou a contar apenas com quatro variáveis de avaliação: creatinina sérica, sexo, idade e etnia. No ano de 2006 foi padronizado o método de avaliação da creatinina sérica, sendo escolhida a espectrometria de massa de diluição isotópica (LEVEY; INKER; CORESH, 2014). O MDRD foi desenvolvido considerando os pacientes com DRC e não considerando pacientes saudáveis e como tal as suas principais limitações são a imprecisão e a não detecção do eRFG em níveis mais altos (STEVEN et al., 2007).

O grupo *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI) foi formado em 2003 pelo *National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*, sendo a equação CKD-EPI desenvolvida em 2009 por este grupo, para ser tão precisa quanto o MDRD em eRFG menor que 60 mL/min/1,73m² e mais precisa nos casos de eRFG maior, utilizando pacientes com função renal reduzida e indivíduos saudáveis. A equação de CKD-EPI se apresenta como a equação de estimativa do eRFG mais acertiva que fora avaliada em um grande número de pacientes, sendo facilmente utilizada por laboratórios clínicos e aplicada para uso clínico geral em todo o mundo (LEVEY; INKER; CORESH, 2014).

Embora não haja dúvidas sobre a sua importância, ainda não há consenso sobre a melhor fórmula de cálculo para o eRFG, apesar da CKD-EPI despontar tanto no monitoramento dos pacientes com DRC, quanto na avaliação renal do potencial doador vivo. A avaliação renal correta do doador também é fundamental, diante da sua influência futura e decisiva para a estabilidade do enxerto (BURBALLA et al., 2017).

Mesmo com a ausência de consenso, nos pacientes transplantados renais o eRFG ainda é um dos principais indicadores da função do enxerto, podendo prever a sobrevida deste a longo prazo. Dado o seu valor prognóstico, o cálculo do eRFG pode ser acompanhado tanto no doador vivo potencial quanto no paciente pós-transplante podendo servir como um indicador de sucesso do enxerto. A melhoria nos cuidados com os pacientes transplantados renais, bem como o uso de drogas imunossupressoras podem resultar em um aumento da média do eRFG em pacientes pós-transplante e por consequência melhoria na sobrevida do enxerto (JINFENG et al., 2015; HUANG et al., 2017).

2.1.3 Resposta imunológica no transplante renal

Uma das principais respostas imunológicas do receptor em relação ao enxerto transplantado é a rejeição, considerada um dos principais desafios do transplante. Dessa forma o sucesso do transplante está diretamente relacionado ao controle do sistema imune, que se apresenta como uma rede complexa de células, citocinas, sistema do complemento e anticorpos. Diante de tal importância vários estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar os motivos relacionados à rejeição (SADEGHI et al., 2003; NAZARI et al., 2013; SHIPCOVA; WIELAND, 2016; EROL et al., 2017; DAVIS; COOPER, 2017).

Os primeiros estudos relacionados a imunologia da rejeição começaram em 1940 quando pesquisadores utilizaram camundongos isogênicos, geneticamente idênticos, que demonstraram um *locus* genético altamente polimórfico, o gene H-2, com produtos responsáveis pela rápida rejeição ao enxerto. Com o avanço dos estudos, os pesquisadores identificaram que a região que controlava a rejeição continha vários genes ligados, sendo chamada Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC - *Major Histocompatibility Complex*). O MHC codifica proteínas especializadas responsáveis pela apresentação de antígenos ligados às células, para o reconhecimento do linfócito T. O MHC humano foi descoberto quando observaram que pacientes que realizavam transfusão de sangue e/ou transplante renal continham previamente anticorpos que reconheciam células dos doadores, sendo as proteínas reconhecidas por esses anticorpos chamadas de antígeno leucocitário humano (HLA - *Human Leucocyte Antigens*), genes que codificam várias proteínas de superfície da membrana celular. O HLA é codificado por genes polimórficos, que diferem entre os indivíduos, ou seja, quando duas pessoas compartilham o mesmo HLA, são consideradas compatíveis imunologicamente. Considerando então que o transplante seja realizado entre doador e receptor diferentes geneticamente haverá antígenos polimórficos diferentes de HLA, podendo gerar então uma resposta humoral pelo receptor (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; SHIPCOVA; WIELAND, 2016).

A resposta humoral ao enxerto é resultante do reconhecimento do receptor aos antígenos HLA do doador não compatíveis e o consequente desenvolvimento de anticorpos anti-HLA contra o enxerto, porém a rejeição também pode ocorrer em transplantados HLA idêntico. Além dos anti-HLA, alguns anticorpos endoteliais não-HLA, potencialmente patogênicos foram identificados, dentre eles os anticorpos dos

receptores tipo 1 da ANG II (anti-AT1), que passaram a ser considerados como um fator de risco independente para a perda do enxerto (SIGDEL; SARWAL, 2013).

De forma indiferente à sua origem, a rejeição pode resultar da ligação do anticorpo ao seu respectivo alvo na célula endotelial do enxerto, mudando o sistema do complemento, que antes agia como um mediador anti-inflamatório e passa a agir como um importante mediador pró-inflamatório desencadeando a resposta inflamatória ao enxerto, a rejeição (DAVIS; COOPER, 2017).

A rejeição pode ser classificada de três formas: hiperaguda, aguda e crônica. A rejeição hiperaguda é caracterizada pela rejeição ainda na sala de cirurgia ou em até 24 horas após transplante, causada por anticorpos pré-formados do receptor – (anti-HLA) ou contra o sistema ABO ou, ainda, contra antígenos das células endoteliais do paciente transplantado, causando a perda rápida e irreversível do órgão. Na rejeição aguda, a resposta celular é mediada por células T que infiltram o aloenxerto, que reconhecem moléculas do HLA no rim do doador, podendo ocorrer entre 3 dias a 3 meses pós transplante, desencadeando efeitos inflamatórios e citotóxicos no aloenxerto. A rejeição aguda mediada por anticorpos ocorre em pacientes alossensibilizados e foi relatada ocorrendo em até 7% dos pacientes, podendo chegar em até 50% em transplantes com HLA não compatível, se tornando um dos principais focos dos estudos relacionados a transplante. Já a rejeição crônica ocorre ao longo da evolução do transplante diante de episódios de rejeição aguda, baixa compatibilidade HLA, toxicidade dos imunossupressores, lesão de isquemia/reperfusão, hipertensão, entre outros, que levam à perda funcional lenta e progressiva do rim transplantado, sendo a mais comum entre todos os tipos de rejeição. Qualquer lesão que altere o rim transplantado, como a rejeição, pode levar a produção de anticorpos específicos do doador *de novo*, levando à perda do enxerto ou agravamento da hipertensão pós-transplante (MOROZUMI et al., 2016; EROL et al., 2017; DAVIS; COOPER, 2017; WEIR et al., 2015).

2.2 O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NO TRANSPLANTE RENAL

No transplante renal o enxerto do doador precisa se adaptar ao ambiente molecular e hemodinâmico do receptor, sendo necessária sua adaptação frente a regulação da PA, homeostase dos sais e fluídos e regulação da secreção de REN, sendo todos esses processos relacionados ao SRA (ANTLANGER et al., 2017).

Os efeitos do SRA sobre a regulação da PA foram primeiramente descritos em 1898 pelo fisiologista Tigerstedt e seu aluno Bergmann (KUNIKULLAYA; ANANTHAKRISHNAN; GOTURU, 2012). Eles demonstraram a partir da observação de animais anestesiados pela infusão de uma substância termolábil, retirada do córtex renal de coelho, o aumento da PA nestes animais, propondo para esta substância o nome de renina (PHILLIPS; SCHMIDT-OTT, 1999). Desde então o SRA tem sido exaustivamente estudado, sendo compreendido como um complexo sistema e de grandes implicações fisiopatológicas (BALAKUNAR et al., 2017).

O SRA tem papel fundamental na homeostasia hidroeletrólítica do organismo, homeostase circulatória, na coordenação do processo de vasodilatação e vasoconstrição e, por consequência, no controle da PA. Essas ações são coordenadas por meio da integração do sistema renal, cardiovascular e nervoso central. Em sua forma clássica (circulatória), o SRA envolve a clivagem de peptídeos em uma cascata coordenada de processos enzimáticos. Essa cascata inicia-se pela clivagem do angiotensinogênio (AGT), pela REN para produzir ANG I, que é convertida pela ECA em ANG II, o principal peptídeo multifuncional deste sistema. A ANGII age por meio de dois tipos de receptores, o tipo I (AT1) e do tipo II (AT2) (RIGATTO; BOHLKE; IRIGOYEN, 2004).

Em contrapartida, com o passar dos anos, diante da comprovação de componentes do SRA em vários tecidos como vaso sanguíneo, cérebro, coração, rins, glândulas adrenais e órgãos reprodutores, essa visão clássica, na qual o sistema seria essencialmente dependente do hormônio circulante para produzir seus efeitos fisiológicos, tem sido modificada. Diante disso, foi inserido o conceito de um SRA local/tecidual, podendo agir de forma dependente do SRA clássico e em alguns órgãos de forma independente. Tal descoberta foi possível diante dos avanços das técnicas de biologia molecular que permitiram evidenciar a existência de componentes do SRA em tecidos periféricos. Enquanto o SRA circulatório está associado à regulação do volume sistêmico, balanço hidroeletrólítico, homeostase e controle da PA, o SRA tecidual/local envolve a proliferação, o crescimento celular e a síntese proteica (SANJULIANI et al., 2011; SPARKS, 2014).

A REN é uma aspartil transferase que tem sua fonte primária exclusiva nos rins, sendo produzida nas células justaglomerulares das arteríolas aferentes renais, tendo como precursor a pró-renina. A secreção de REN é estimulada pelos barorreceptores que respondem à pressão de perfusão reduzida e à diminuição no volume sistêmico

e estimulam a liberação de REN através dos grânulos de secreção. O contrário também é procedente onde a síntese de pró-renina é inibida por condições de aumento da perfusão renal e da PA, além de sobrecarga de volume (SAYER; BHAT, 2014).

O AGT é o substrato da REN produzido e secretado pelo fígado, sendo encontrado também nos rins e em outros tecidos, como coração, cérebro, glândulas adrenais, vasos sanguíneos e órgãos reprodutores. Um ponto importante nessa produção tecidual é que pode haver uma regulação independente do AGT em compartimentos de tecido individual, formando uma base local do SRA que atua de forma independente do SRA circulatório (CHAPPELL et al., 2012).

A ANG II é a molécula efetora deste sistema, responsável pela maioria dos efeitos fisiológicos, agindo como potente vasoconstritor direto, sendo a maior reguladora do equilíbrio hemodinâmico e da homeostase hidroeletrolítica, participando do crescimento celular e do processo de remodelamento cardiovascular. Exerce suas ações via receptores AT1 e AT2. Os receptores medeiam ações opostas, sendo que o AT1 medeia ações deletérias, desde que em desequilíbrio e o AT2 parece induzir ações de proteção. No rim, em condições patológicas, as interações da ANG II através do AT1 resultam na vasoconstrição, sendo a ANG II um importante mediador, quando cronicamente elevada, na geração de lesão tecidual com proliferação celular, hipertrofia, fibrose, inflamação e estresse oxidativo. As espécies reativas de oxigênio (EROs) estão fortemente associadas a este processo, resultando em inflamação, aterosclerose e envelhecimento vascular. Já o AT2, contrabalanceando o AT1, promove vasodilatação, liberação de bradicinina e óxido nítrico, inibição de crescimento e proliferação celular (ORTIZ-MELO, GURLEY, 2015; JI et al., 2017; SATOU et al., 2018)

Entre os diversos componentes do SRA, a ECA é particularmente importante como mediadora e reguladora da produção de ANGII, estando envolvida no metabolismo de dois dos principais peptídeos vasoativos, convertendo a ANG I no vasoconstritor ANG II e inativando o vasodilatador bradicinina. Assim, funcionalmente, as ações da ECA resultam potencialmente no aumento da vasoconstrição e diminuição da vasodilatação. A ECA desempenha um papel importante no sistema renal e cardiovascular para além do SRA, através de seu principal produto, a ANG II, que tem ações direta na função, estrutura do coração e vasculatura renal, promovendo diversas patologias, como isquemia miocárdica, arritmia cardíaca, alteração no

equilíbrio coagulação-fibrinólise e no estresse oxidativo, possuindo também um padrão de expressão onipresente, sendo encontrada nos testículos, intestino, pulmão, fígado e sistema nervoso central, participando também das ações do SRA tecidual/local (RIBEIRO, 2003; ESPINEL, 2005; BURNS, 2007; ORTIZ-MELO; GURLEY, 2015).

Devido à forte associação da HA, resultante de ações do SRA, com o transplante renal, os polimorfismos em genes candidatos deste sistema e, especificamente, polimorfismo inserção/deleção (I/D) no gene *ECA* têm sido exaustivamente analisados, já que o alelo D está associado a maior concentração de *ECA* no sangue e ao aumento da atividade do SRA, sendo demonstrados como determinantes genéticos de diversas doenças. O estudo de novos biomarcadores associados à HA e a outras doenças pode ser considerado uma importante ferramenta com potencial valor preditivo na progressão das doenças (RIBEIRO, 2003; ISRANI et al., 2007).

2.2.1 A hipertensão arterial no transplante renal

A HA possui uma fisiopatologia complexa e multifatorial, apresentando-se como uma das causas mais comuns de mortalidade em todo o mundo, sendo um dos principais fatores de risco para infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca e DRC. Denomina-se como hipertensão primária ou essencial a elevação da PA sem uma doença prévia associada, ocorrendo por razões multifatoriais, incluindo fatores genéticos e ambientais, como idade, sexo e estilo de vida. A hipertensão secundária está relacionada a uma causa específica como, por exemplo, as doenças renais agudas e crônicas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015; HAMRAHIAN; FALKNER, 2016; WERMELT; SCHUNKERT, 2017).

O rim é um órgão efetor no controle da PA, com diversas frentes de ação. A regulação da PA é um processo complexo, com interações de vários mecanismos agindo em paralelo. Como mecanismos de ação rápida temos os barorreceptores e quimiorreceptores, e a resposta do sistema nervoso central (SNC) sendo capazes de responder a uma mudança hemodinâmica circulatória repentina, como nas hemorragias ou até mesmo na mudança postural do corpo humano. Outro mecanismo importante é o controle e excreção de sódio e água realizado pelo organismo, já que a pressão de perfusão renal exerce uma profunda influência sobre a excreção de sódio

e água, sendo este processo conhecido como natriurese pressórica. Quando a PA se eleva há o aumento da excreção de sódio e líquido extracelular, reduzindo o volume sanguíneo e por consequência a PA, o inverso ocorre quando o paciente está em um estado de hipotensão retendo sódio e água (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SRA está intimamente relacionado a patogênese da HA. A ANG II, um produto da ação da renina (REN), atua de diversas formas frente a hipertensão. Promove a vasoconstrição, libera aldosterona no córtex adrenal, catecolaminas na medula adrenal, inicia a liberação de adrenalina no cérebro e promove a ingestão de água através de estímulos cerebrais. Todas essas ações colaboram para o aumento da PA influenciando e aumentando a resistência vascular periférica e a retenção de sódio e água. Para inibir essa sequência homeostática fisiológica, o organismo trabalha através de um feedback negativo, quando na presença de um excesso de ANG II a liberação de REN é inibida (SANJULIANI et al., 2011).

Diante da alta prevalência da HA em todo o mundo, faz-se necessário a padronização dos critérios de diagnóstico destes pacientes. No Brasil, segundo a 7ª Diretriz Brasileira de Hipertensão Arterial (2016), a aferição da PA deve ocorrer em todas as consultas médicas independente da especialidade e recomenda-se a aferição a cada dois anos para adultos com PA \leq 120/80 mmHg e anualmente para aqueles com PA $>$ 120/80 mmHg e $<$ 140/90 mmHg. Os limites de PA considerados normais são variantes, já que podem variar de acordo com as condições clínicas, uma vez que diversos fatores podem interferir nesta padronização. Entretanto, valores que classificam o comportamento da PA em adultos por meio de medidas casuais ou de consultório, já que essas medidas apresentam simplicidade e baixo custo, estão expressos no **Quadro 3**, sendo considerado pressão sistólica isolada se PAS \geq 140 mmHg e PAD, 90 mmHg, devendo a mesma ser classificada em estágios 1, 2, 3 (SBC, 2017).

Quadro 3- Classificação da pressão arterial de acordo com a medição casual ou no consultório a partir de 18 anos de idade

Classificação	PAS (mmHg)	PAD (mmHg)
Normal	\leq 120	\leq 80
Pré-hipertensão	121-139	81-89
Hipertensão estágio 1	140-159	90-99
Hipertensão estágio 2	160-179	100-109

PAS: Pressão arterial sistólica PAD: Pressão arterial diastólica
Fonte: SBC, 2017 (modificado)

A avaliação laboratorial de rotina do paciente hipertenso engloba a análise de urina rotina, o potássio sérico, glicemia em jejum e o teste de hemoglobina glicada (HbA1c), o eRFG, creatinina sérica, colesterol total e frações e ácido úrico sérico (SBC, 2017).

O eRFG tem destaque na identificação do grau de disfunção e a progressão da DRC. A HA e a DRC têm uma relação única, na medida que podem ser causa e/ou consequência uma da outra. Na DRC há alterações fisiológicas na quantidade de néfrons com uma troca tubular renal anormal, o que leva a um declínio da excreção de sódio e água em um ambiente de hipertensão. Outro ponto importante a ser observado na relação da DRC com a HA é o aumento da atividade do SRA que secreta REN em resposta a baixa perfusão renal. Os doentes renais, em decorrência da isquemia renal, liberam um excesso de REN, sendo a provável causa da atividade anormal do SRA na DRC (GARGIULO et al., 2015).

Na tentativa de controlar as alterações provocadas pelo estímulo exacerbado ao SRA, são utilizadas medicações que bloqueiam o SRA, atuando de forma a diminuir a PA, melhorando a proteinúria do paciente e retardando a progressão da DRC. Os fármacos inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECA) são indicados para tratamento da DRC, conferindo um efeito antiproteinúrico e renoprotetor, além de seu efeito sistêmico sobre a PA (VIAZZI; LEONCINI; PONTREMOLI, 2013).

Outras medicações anti-hipertensivas podem ser associadas como bloqueador do receptor da angiotensina (BRA), betabloqueadores, diuréticos, antagonistas dos canais de cálcio (WERMELT; SCHUNKERT, 2017).

Comumente, nos pacientes com DRC, o uso de anti-hipertensivos pode ser realizado como um manejo conservador, ou seja, os pacientes podem fazer uso da medicação anti-hipertensiva mesmo sem a presença da HA, já que nessa população a redução pressórica constitui a medida mais eficaz para a redução do risco de cardiovascular e atenuação da progressão da lesão renal (KIRSZTAJN et al., 2013).

Os pacientes que estão com DRC e não conseguem reverter o quadro são indicados ao transplante renal. Muitos pacientes são encaminhados ao transplante renal já com a HA instalada, porém alguns a adquirem após o transplante. A maioria dos casos ocorre em decorrência do uso de drogas imunossupressoras, como os

inibidores de calcineurina (CNIs) e os corticoesteróides. Os CNIS, especialmente o tacrolimus (TAC) e a ciclosporina (CSA), aumentam a vasoconstrição renal e a hipoperfusão renal. Já os corticoesteróides estão relacionadas à retenção de sódio, expansão de volume e aumento da resposta vasopressora, ambos acarretando o aumento da PA (AZIS et al., 2018).

A HA é um fator de risco importante para as doenças cardiovasculares, e o óbito pós-transplante tem como uma das principais causas as doenças cardiovasculares estando intimamente interligada a sobrevida do enxerto e do paciente. Diversos fatores podem levar ao desenvolvimento ou a progressão da HA pós-transplante incluindo as características do doador e receptor, a qualidade da função do enxerto renal, as complicações do transplante e as medicações imunossupressoras já citadas. A HA é perfeitamente tratável e de fácil monitoramento, o grande desafio é adaptar as medicações imunossupressoras para alcançar o equilíbrio entre a necessidade de evitar a rejeição do enxerto e necessidade diminuir a PA (TOMAS; TABER; SRINIVAS, 2013).

Uma das principais causas de perda do enxerto renal precocemente é óbito com enxerto funcional, relacionado a causas cardiovasculares, infecciosas e rejeição (MALHOTRA et al., 2019), prevalecendo no Brasil as relacionadas à infecção. O risco de óbito acentua-se com a idade e a presença de comorbidades como HA, DM e dislipidemia (FERREIRA et al., 2017).

2.3 POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA E SUA INFLUÊNCIA NO PROGNÓSTICO DO TRANSPLANTE RENAL

Diante dos avanços da biologia molecular, biotecnologia e o mapeamento do genoma humano, houve um grande interesse sobre a variação genética natural, seu significado clínico e funcional. A variação genética na sequência de *deoxyribonucleic acid* (DNA) pode assumir diversas formas, como a substituição de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), inserção ou deleção de nucleotídeos (I/D), alterações no número de sequências repetitivas e mudanças na estrutura do cromossomo (BALASUBRAMANIAN, 2004).

Um segmento de DNA que ocupa uma posição ou localização particular no cromossomo é denominado *locus*. As versões alternativas na sequência de DNA no *locus* são denominadas alelos, sejam do tipo selvagem com um único alelo predominante, ou mutantes, que diferem do selvagem por uma alteração permanente na sequência de nucleotídeos ou na disposição do DNA. A frequência de variantes ocorre de forma muito ampla na população. Se a variação é encontrada em uma frequência superior a 1% da população, denomina-se polimorfismo. A variação polimórfica em genes pode resultar em alterações regulatórias e estruturais podendo afetar muitas funções metabólicas (THOMPSON & THOMPSON, 2002).

O gene *ECA* (*locus* 17q23) é considerado polimórfico e interfere na modulação da função vascular sistêmica com repercussão orgânica de algumas doenças. As variantes dos polimorfismos nesse gene refletem diferentes níveis de ECA sérica. Portanto, o gene *ECA* desempenha um papel significativo na patogênese da hipertensão essencial (JOYCE-TAN, 2016; ŽIVKOVIĆ, 2016; ZHANG, 2017; HAN et al., 2017).

A **Figura 1** demonstra a localização do gene *ECA*.

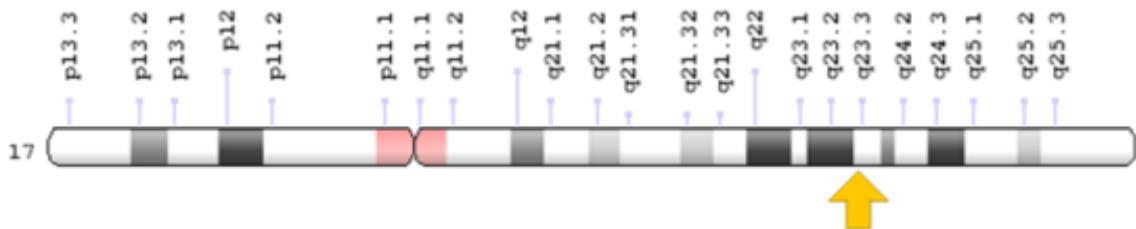


Figura 1- Localização Citogenética: 17q23.3 do polimorfismo I/D do gene *ECA*.

Fonte: Genome Decoration Page/NCBI. SILVEIRA, 2018.

Em 1990, Rigat e colaboradores caracterizaram um polimorfismo no gene da ECA que corresponde à inserção (I) ou deleção (D) de 287 pares de base no íntron 16. Este gene e seus polimorfismos têm sido exaustivamente estudados, buscando sua relação com o prognóstico renal em algumas condições patológicas. A população pode ter a atividade da ECA modulada geneticamente por este polimorfismo e pode apresentar três tipos de genótipos diferentes: genótipo II, ID e DD, tendo como principal resultado a influência na concentração sérica da ECA (RIGAT et al., 1990; ESPINEL, 2007).

O polimorfismo I/D no gene da ECA tem sido associado à progressão de diversas doenças, dentre elas as doenças renais e as complicações cardiovasculares. O genótipo DD está associado a uma maior atividade e concentração sérica da ECA e ao aumento do risco de rejeição, sendo que o genótipo ID tem uma relação intermediária e o genótipo II apresenta as menores concentrações de ECA. Estima-se que o alelo D contribua com aproximadamente metade da variação dos níveis plasmáticos da ECA, sugerindo que os pacientes com genótipo DD possam ter níveis mais elevados de ANG II, o que resultaria em um consequente aumento da PA, sendo considerado um fator de risco genético para disfunção renal e circulatória (TAAL, 2000; PEDROSO et al., 2010; AZMANDIAN, 2015).

Estudos sugerem uma relação entre o polimorfismo do gene da ECA (I/D) e a sobrevida e prognóstico do enxerto renal, mas esta relação ainda é controversa. Huang e colaboradores (2015), por exemplo, demonstraram fortes evidências na relação entre o polimorfismo I/D no gene da ECA e o prognóstico de pacientes transplantados renais. Em contrapartida, Yang e colaboradores (2015) e Azmandian e colaboradores (2015), não encontraram evidências na associação entre o polimorfismo I/D e a sobrevida do enxerto renal em caucasianos, brasileiros e asiáticos.

Cabe destacar que o desequilíbrio gênico e as diferenças étnicas de certas populações, associados à influência dos fatores de risco convencionais podem mascarar a verdadeira ação deste gene. Em caucasianos, o polimorfismo I/D foi responsável por quase metade da variância fenotípica total da ECA (HAN et al., 2017). Na população asiática o alelo D da ECA e o genótipo DD foram associados à maior sobrevida do enxerto renal após o transplante renal (YANG et al., 2015). Segundo um estudo realizado no Brasil, frequências alélicas e genotípicas nas diversas regiões do país são semelhantes, com exceção da região Sul que tem grande interferência caucasiana em sua conformação genética (INÁCIO; FILHO; VIEIRA, 2004).

Diante de tamanha diversidade étnica, considerando que a ECA é um importante regulador do SRA, que tem uma ação significativa na inflamação e alteração da PA influenciada pela ANG II e que o polimorfismo I/D aumenta a atividade deste sistema, pode se considerar uma possível lesão dos órgãos alvos, mediada por tais alterações. Tudo isso também pode aumentar a geração de EROs e de citocinas no organismo dos pacientes, tornando cada vez mais necessário o estudo da relação

entre este polimorfismo e marcadores inflamatórios no transplante renal (RASHED et al., 2015; SATOU et al., 2018).

2.4 INTERLEUCINA-1 β E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO PLASMA

A inflamação é a resposta imunológica do organismo frente a danos nos tecidos, seja causada por microrganismos como bactérias e vírus ou por agentes físicos, como trauma, cirurgia e lesões. O processo inflamatório pode ser classificado como agudo, de início abrupto, resultante de uma resposta imune inicial com presença de dor, rubor e edema. Neste processo inicial de defesa do organismo, há aumento do fluxo sanguíneo, leucócitos e anticorpos para o tecido lesado. A inflamação crônica é proveniente da falha de algum destes processos de defesa, onde os neutrófilos são substituídos por macrófagos e as células T estão presentes. Diante do dano progressivo e a longo prazo, a destruição de elementos teciduais pode levar ao desenvolvimento de diversas patologias, dentre elas as renais (ZHOU et al., 2010).

O transplante renal é um importante indutor de uma intensa reação inflamatória, já que o órgão doado é repleto de antígenos imunogênicos e é inserido no sistema imune do receptor precisando se adaptar (PEREIRA, 2009). O processo de inflamação tende a diminuir com o tempo, mas pode persistir, especialmente no primeiro ano após transplante em uma parcela importante de transplantados (CHANDRAN et al., 2017).

Os pacientes transplantados renais podem apresentar uma inflamação subclínica precoce associada à fibrose e a disfunção tardia do enxerto. A fibrose é um processo normal de cicatrização e reparo de feridas que é ativado frente a lesões, a fim de manter a arquitetura e a integridade das funções originais do órgão. Entretanto, quando há exacerbação ou desregulação deste processo inflamatório pode haver a deposição de um excesso de matriz extracelular nos rins, resultando em cicatrizes fibrosas levando ao colapso do parênquima e à perda da função renal (TORRES et al., 2014).

A fim de evitar a perda da função renal e com a necessidade de se monitorar rotineiramente o processo inflamatório nos pacientes transplantados renais, tem-se utilizado cada vez mais novos biomarcadores com valores preditivos significativos para monitorar a intrincada resposta inflamatória desencadeada após o transplante renal, como as citocinas e outros marcadores inflamatórios, como aqueles capazes de avaliar o potencial estresse oxidativo. Os marcadores associados ao estresse

oxidativo se baseiam nos produtos de oxidação de lipídios, proteínas e DNA ou aferição da capacidade antioxidante de amostras biológicas. Para a avaliação do estresse oxidativo é necessário avaliar a produção de ERO ou ERN. O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio e a ausência de um aumento equivalente de uma resposta antioxidante define um estado de estresse oxidativo (BARBOSA et al., 2010; ZHOU et al., 2010).

A instalação do processo de estresse oxidativo é resultante do desequilíbrio entre a geração de EROs e os múltiplos sistemas de defesa antioxidantes. Um perfeito equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes representa a condição essencial para a homeostase. A geração de radicais livres constitui um processo contínuo e fisiológico que cumpre funções biológicas importantes. Os radicais livres são considerados os principais mediadores do estresse oxidativo e durante os processos metabólicos atuam como mediadores para transferência de elétrons nas diversas reações bioquímicas, possibilitando a geração de ATP através da cadeia transportadora de elétrons, ativação de genes e participação nos mecanismos de defesa contra infecções (GHORBANIHAGHIO et al., 2008; BARBOSA et al., 2010).

Os radicais livres são constantemente gerados *in vivo* pelo metabolismo do oxigênio nas mitocôndrias, membranas celulares e citoplasma. A mitocôndria, através da cadeia transportadora de elétrons, é a principal fonte geradora de radicais livres. Havendo um desequilíbrio no mecanismo de formação oxidante e antioxidante, com produção exacerbada de radicais livres, pode-se conduzir a danos oxidativos, já que esse processo resulta na oxidação de moléculas com consequente perda das funções biológicas e perda da homeostase. Diante de um possível prolongamento e cronicidade desse desequilíbrio derivam-se numerosas enfermidades crônicas não transmissíveis como DM, aterosclerose, obesidade e câncer (BARBOSA et al., 2010).

As EROs podem ser produzidas de forma endógena e exógena. Na via endógena podem ser geradas por processos enzimáticos, como na respiração celular (cadeia de transporte de elétrons mitocondrial) e por células do sistema imunológico no processo inflamatório. Outro processo endógeno e importante é a atividade do complexo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase, que ocorre quando há estimulação de células polimorfonucleares e monócitos. Em algumas patologias é possível notar uma maior formação de EROs, como na DRC, devido ao prolongamento da inflamação, que resulta na disfunção do endotélio e em patologias associadas a ANG II, como a hipertensão, já que a ANG II é um importante produtor

de EROs e aumenta a atividade de NADPH. A via exógena pode ser induzida por fatores externos, como produtos químicos, poluentes, medicamentos e exposição a raios UV (KRATA et al., 2018).

Os EROs atuam na sinalização redox e no sistema imune, sendo produzidos em grande quantidade na inflamação. O equilíbrio entre os sistemas pró e antioxidantes é essencial para o funcionamento normal das células e de todo o organismo. Nos pacientes transplantados tende-se a observar um profundo desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes, com níveis elevados de EROs diante da longa duração da inflamação. As EROs reagem diretamente com lipídeos das membranas celulares, levando à oxidação do DNA e proteínas, causando disfunção celular. Além disso, diante do comprometimento da função renal, há acúmulo de toxinas e resíduos metabólicos, levando a um desequilíbrio na homeostase redox (LA RUSSA et al., 2017).

Os biomarcadores associados ao estresse oxidativo desempenham importante papel na gênese de processos metabólicos e são considerados novas ferramentas de diagnóstico de várias doenças, com potencial para elucidação de mecanismos e implicações biológicas do dano oxidativo, particularmente associados a pacientes com enfermidades crônicas, possibilitando realizar um planejamento de ações eficazes no controle e prevenção. (BARBOSA et al., 2010; MUCHA; FORONCEWICZ; PAÇZEK, 2016).

O método para avaliação da capacidade antioxidante do plasma, objeto deste estudo, se baseia na redução do sal MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)]. O MTT é um composto que quando absorvido pelas células, através de endocitose, pode ser reduzido por enzimas mitocondriais, formando um produto de cor púrpura denominado formazan, diretamente proporcional à capacidade redutora e/ou antioxidante da amostra testada (CARMICHAEL, 1987).

O MTT é um sal tetrazólico que pode ser reduzido por antioxidantes como o ascorbato, urato, tocoferol, albumina e o grupo das sulfidril proteínas, formando cristais de formazana que possuem cor púrpura e são solúveis em isopropanol (MEDINA et al., 2007)

Todos esses métodos estão associados à busca por novos biomarcadores no processo inflamatório do transplante renal, destacando-se também neste cenário, as citocinas. As citocinas pertencem a um grupo de proteínas de baixo peso molecular, produzidas por diferentes tipos de células com efeitos autócrinos, parácrinos e

endócrinos, sendo envolvidas no controle e propagação da resposta imunológica com diferentes vias de sinalização. São divididas em várias classes, como interleucinas (IL), fatores de necrose tumoral, interferons, fatores estimuladores de colônia, fatores transformantes de crescimento e quimiocinas. As citocinas são muito importantes no processo de comunicação celular e são produzidas por uma ampla variedade de células do sistema imune (CARVALHO; DOMINGUETI, 2016).

A dosagem de citocinas no transplante renal tem sido utilizada como uma ferramenta alternativa no diagnóstico de complicações do transplante, como a rejeição aguda e a fibrose intersticial. As citocinas podem influenciar em vários aspectos relacionados ao transplante, ao recrutar leucócitos para o processo de isquemia/reperfusão, na resposta do receptor a infecções durante a supressão imunológica e no controle da rejeição aguda e fibrose intersticial (HU; KNETCHLE, 2006).

As citocinas atuam como comunicadores intercelulares, podendo alterar o comportamento dos leucócitos, atuando em forma de rede (LEE et al., 2004), compondo um importante sistema homeostático com ações potentes de vigilância imunológica, crescimento, desenvolvimento e reparo celular (HUISING et al, 2004).

Podem ser detectadas em células de tecido renal, sangue e urina dos pacientes, podendo sofrer interferência na sua expressão devido ao uso de medicamentos anti-inflamatórios, inibidores da ECA, imunossupressores e antagonistas de receptores de citocinas e por consequência alterar a evolução do transplante renal (PEREIRA et al., 2009).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória potente de rápida resposta, que induz uma cascata de efeitos que levam a resposta inflamatória e atua na defesa do paciente. Também é capaz de causar ativação dos vasos, aumento à aderência de neutrófilos e linfócitos às células endoteliais, podendo estar relacionada à biologia imunológica da rejeição aguda e crônica do enxerto (LEE et al., 2004). A desregulação da síntese e liberação da IL-1 β contribui para a patogênese das doenças inflamatórias e imunomediadas, sendo que no transplante renal ela pode preceder o desfecho desfavorável do enxerto, seja proveniente do doador ou do receptor, podendo ser utilizada como um importante biomarcador pré-transplante não HLA (BHAT et al., 2017).

A resposta das citocinas ao processo inflamatório mediado por lesão ou infecção depende da concentração do fator de necrose tumoral (TNF) e da IL-1. A

liberação de citocinas facilita o influxo de linfócitos, neutrófilos, monócitos e outras células para o local da lesão, atuando frente a antígenos e na cicatrização dos tecidos (OSTROWSKI et al., 1999), desempenhando assim um papel fundamental nas doenças inflamatórias e imunomediadas.

A IL-1 β está envolvida em uma variedade de atividades celulares, incluindo a proliferação, diferenciação e apoptose celular, sendo produzida e liberada rapidamente por inúmeros tipos de células imunes e outras células que ativam os linfócitos T em resposta a sinais inflamatórios. É considerada altamente pirogênica por atuar como um amplificador de reações imunes. Induz um aumento da expressão das moléculas de adesão e promove um aumento da permeabilidade das células endoteliais e altera a hemodinâmica glomerular (ZHAO; ZHOU; SU, 2013; CARVALHO; DOMINGUETI, 2016; BENT et al., 2018).

Sendo a inflamação considerada como um marco na DRC e no transplante renal, ainda não está elucidado se a inflamação é um correlato precoce da redução do eRFG ou se é um fenômeno tardio associado ao comprometimento grave do eRFG. A IL1 pode causar mudanças consistentes na permeabilidade vascular e no eRFG. Sabe-se que o aumento da permeabilidade microvascular causa o aumento do extravasamento de macromoléculas, com microalbuminúria e proteinúria para o interstício durante o processo de inflamação renal (PALOMO et al., 2015).

Desta forma, a avaliação de novos biomarcadores genéticos e inflamatórios no transplante renal desponta como uma potencial proposição de diagnóstico e monitoramento deste importante grupo de pacientes.

3 JUSTIFICATIVA

Diversos são os desafios enfrentados pelas equipes de transplante renal, dentre eles destaca-se a rejeição ao enxerto. O transplante renal evoluiu muito nos últimos anos, mas se faz cada vez mais necessário a utilização de biomarcadores menos invasivos, uma melhor elucidação da participação de elementos imunológicos e de marcadores de inflamação no transplante renal. Assim, novos biomarcadores precisam ser mais bem explorados.

Os polimorfismos e os marcadores de inflamação, se encaixam bem neste contexto. Sugere-se que esses marcadores possibilitem uma personalização do tratamento, especificamente o polimorfismo I/D do gene da ECA, a interleucina 1 beta e os marcadores de estresse oxidativo. O processo que envolve as três frentes é cíclico, levantando a possibilidade de que uma intervenção em qualquer ponto deste ciclo pudesse ajudar a resposta do paciente frente ao transplante.

A presença do polimorfismo I/D do gene da ECA altera a produção de ANG II, produzida pelo SRA, e está, por sua vez, induz a vasoconstrição e consequente elevação da PA. Além dessa ação direta, a ANG II quando cronicamente elevada estimula a geração de estresse oxidativo e ativação do sistema imunológico com a liberação de citocinas pró-inflamatórias que regulam o SRA, acelerando ainda mais a formação de ANG II. No processo, os fatores inflamatórios produzidos pelo sistema imune e pelo SRA interagem intimamente e promovem sinergicamente a elevação da pressão arterial e o desenvolvimento de lesão tecidual associada ao SRA (HUANG et al., 2015; SATOU et al., 2018)

Além disso existem lacunas importantes na literatura, quando se trata da avaliação do polimorfismo da ECA em função de marcadores inflamatórios no transplante renal. De tal forma, a detecção de variações genéticas e de marcadores inflamatórios que podem influenciar o equilíbrio entre os níveis de ANG II e que podem, por consequência, afetar o aparecimento de lesão renal até o desfecho do transplante renal, representa uma ferramenta em potencial, o que justificaria este estudo.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o polimorfismo inserção/deleção (I/D) do gene *ECA*, a interleucina 1 beta e capacidade antioxidante do plasma, correlacionando-os à função do enxerto e à história prévia de rejeição.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o polimorfismo I/D do gene da ECA em pacientes transplantados renais, correlacionando tais achados à função renal do enxerto e à episódios prévios de rejeição;
- Determinar as frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D em função dos níveis plasmáticos de creatinina, ritmo de filtração glomerular estimado, história prévia de rejeição.
- Mensurar os níveis da interleucina IL-1 beta e determinar o perfil antioxidante do plasma por meio da redução do sal de tetrazólio relacionando-os ao polimorfismo I/D da ECA, aos marcadores de função renal avaliados, histórico de rejeição e o tempo pós-transplante dos transplantados renais.
- Associar os biomarcadores investigados com a presença de hipertensão arterial e às drogas imunossupressoras em uso, bem como a outros parâmetros clínicos .

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ASPECTOS ÉTICOS

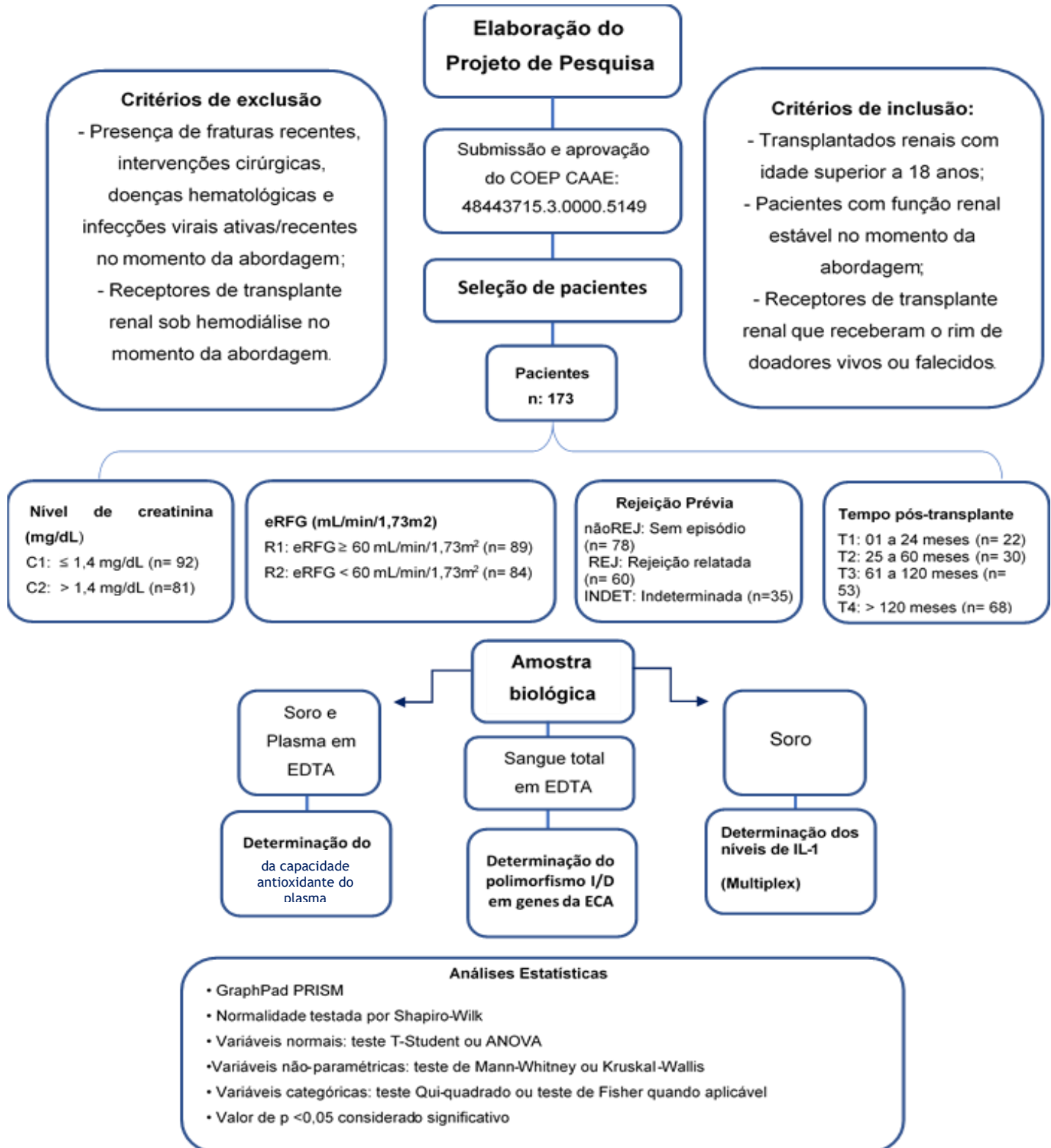


Figura 2 - Delineamento experimental. COEP: Comitê de Ética em Pesquisa. eRFG: ritmo de filtração glomerular estimado.

O Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais aprovou o corrente projeto, CAAE – 48443715.3.0000.5149, sob o ponto de vista ético e formal com o título original “Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos em pacientes transplantados renais” (**ANEXO A e B**).

Todos os participantes envolvidos foram esclarecidos quanto aos objetivos propostos nesta pesquisa. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**APÊNDICE A**) foi obtida de todos os voluntários no momento da coleta de sangue. Uma ficha clínica (**APÊNDICE B**) foi elaborada e preenchida para cada participante do estudo.

5.2 CASUÍSTICA

Para este estudo transversal-observacional, foram selecionados 173 pacientes transplantados renais do setor de transplantes da Unidade Bias Fortes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (HC/UFMG). As coletas foram realizadas por um grupo de estudantes do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais no ano de 2014.

Este trabalho faz parte de um projeto maior que foi desmembrado em diversas frentes de estudo. O banco de dados tem sido alimentado constantemente com novas informações. Baseando-se na experiência clínica dos nefrologistas participantes do estudo, em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa e na literatura (FRIED et al., 2003; MOTA et al., 2015; MOTA et al., 2017; ELNOKEETY; SHAKER; FAYED, 2017), foram estabelecidos valores de corte para a estratificação dos pacientes de acordo com a função renal.

Os pacientes foram divididos em dois grupos de acordo com a creatinina sérica:

- C1: Creatinina igual ou inferior a 1,4 mg/dL (n= 92);
- C2: Creatinina superior a 1,4 mg/dL (n=81).

Os transplantados também foram distribuídos em grupos de acordo com o eRFG. Os cálculos foram feitos pela fórmula *Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration* (CKD-EPI).

O cálculo foi realizado conforme a seguinte equação:

$eRFG = 141 \times \min (Cre/k, 1)^\alpha \times \max (Cre/k, 1)^{-1.209} \times 0,993^{Idade} \times 1,1018$ [se mulher] x 1,159 [se negro]

Os pacientes foram então distribuídos da seguinte maneira:

- R1: eRFG igual ou superior a 60 mL/min/1,73m² (n= 89)
 - R2: eRFG inferior a 60 mL/min/1,73m² (n= 84)
- (MAZANOWSKA et al., 2013; MOTA et al., 2015).

Além disso, os pacientes foram distribuídos em grupos de acordo com a presença ou não de rejeição prévia ao enxerto renal. Os dados destes grupos foram coletados a partir de prontuários médicos. Desta forma, a distribuição ocorreu da seguinte maneira:

- nãoREJ: Sem episódio de rejeição (n=78);
- REJ: Rejeição relatada (n=60);
- INDET: Rejeição indeterminada (n=35).

Os pacientes ainda foram divididos em quatro grupos de acordo com o tempo pós-transplante , exceto para as análises relacionadas ao polimorfismo:

- T1: 01 a 24 meses
- T2: 25 a 60 meses
- T3: 61 a 120 meses
- T4: >120 meses pós transplante

5.2.1 Critérios de inclusão

- Pacientes transplantados renais com função renal estável no momento da abordagem e coleta de sangue;
- Idade superior a 18 anos;
- Pacientes que receberam o rim de doadores vivos ou falecidos.

5.2.2 Critérios de não inclusão ou de exclusão

- Presença de fraturas recentes;
- Pacientes com infecções virais ativas ou em terapia antiviral profilática;
- Presença de intervenções cirúrgicas recentes;
- Sob hemodiálise no momento da abordagem;
- Portadores de distúrbios hematológicos, tais como hemofilias, hemorragias, trombofilia, confirmados por relato médico ou por consulta ao prontuário.

5.3 AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A coleta das amostras sanguíneas foi realizada no Laboratório Central do Hospital das Clínicas da UFMG em 2014. Foram 5,0 mL de sangue venoso em tubos sem anticoagulante (VACUETTE®) de cada paciente do estudo, sendo coleta do sangue realizado a vácuo com obtenção das amostras de sangue total, plasma e soro, respectivamente. No momento da coleta a equipe utilizou todas as condições ideais de transporte e armazenamento das amostras, sendo devidamente acondicionadas e transportadas em caixas térmicas refrigeradas. O tempo máximo de 2 horas até a centrifugação não foi ultrapassado.

5.3.1 Preparo das amostras biológicas

Após a coleta das amostras o grupo de estudantes realizou o preparo das amostras. Foi separada alíquota de 600 µL de sangue total das amostras coletadas em EDTA para a posterior extração de DNA, com a finalidade de investigar o polimorfismo I/D no gene da ECA, sendo as alíquotas das amostras armazenadas de imediato em freezer vertical a -20°C (Electrolux® modelo FE26) e descongeladas apenas para a realização da técnica de extração de DNA genômico. As amostras colhidas em soro e EDTA foram centrifugadas a 3.500 rpm, por 10 minutos, em centrífuga refrigerada (Jouan® modelo BR4i) a 4°C. Alíquotas de 500 µL de soro e plasma foram preparadas e armazenadas em microtubos de polipropileno atóxico de centrifugação (Axygen®) devidamente identificados e, posteriormente, congelados a -80°C.

5.4 MÉTODOS

5.4.1 Determinação do polimorfismo I/D no gene da ECA

5.4.1.1 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído a partir das alíquotas do sangue total, utilizando o kit BIOPUR mini spin® , sendo a técnica realizada de forma rigorosa conforme as instruções do fabricante. Os tubos contendo DNA foram incubados por 1 hora a 65°C e armazenados em freezer vertical a -20°C (Eletrolux® modelo FE26). A técnica detalhada da extração de DNA está contida no **APÊNDICE C**.

5.4.1.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As genotipagens dos polimorfismos genéticos da ECA foram realizadas pela técnica de PCR no laboratório de Biologia Molecular e no Laboratório de Bioquímica Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Para a realização das reações de PCR foram utilizados desoxirribonucleotídeos, tampão (15mM de MgCl₂, 500mM de KCl, 100mM de Tris HCl pH 8,4 e 1% de Triton-100) e a enzima Taq DNA polimerase. O número de ciclos, a concentração de reagentes e a temperatura de anelamento foram padronizados para os segmentos genômicos a serem amplificados com o objetivo de se obter um bom sinal de amplificação com o mínimo de inespecificidade.

As reações foram processadas em termociclador (Bioer Serves Life®), compreendendo de uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 2 minutos, com extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os fragmentos resultantes da PCR foram detectados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%.

5.4.2 Determinação do perfil antioxidante do plasma

5.4.2.1 Ensaio de redução do MTT

A determinação do perfil antioxidante do plasma foi realizada pela técnica de redução do MTT [(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)], um tipo de sal tetrazolium que sofre redução metabolicamente a um produto final colorimétrico, os cristais de formazana (ABREU et al., 2007).

São encontrados no plasma diversos fatores antioxidantes que são capazes de reduzir o MTT. O produto final dessa redução tem sua concentração detectada por absorção da luz, podendo a leitura ser realizada no espectrofotômetro ou leitor de ELISA.

Para cada amostra foram transferidos, em um tubo de ensaio, 100 μ L de soro ou plasma em EDTA, 50 μ L de PBS (*Phosphate Buffered Saline*- Tampão fosfato salino) e 12,5 μ L de solução de MTT. Seguido de incubação em banho-maria a 37° C, por 60 min. Adicionado 750 μ L da solução de isopropanol ácido (álcool isopropílico + HCl 0,04 M). Agitado em vórtex por aproximadamente 30 segundos. Centrifugado por 10min a 3000rpm. A leitura do sobrenadante foi feita no espectrofotômetro a 570nm, sendo utilizado o equipamento Spectra Max 384 Plus.

5.4.3 Determinação da Interleucina 1 beta (IL-1 β)

A IL-1 β foi quantificada utilizando o kit Milliplex® MAP (*Human Bone Magnetic Bead Panel* - HBNMAG-51K, EMD Millipore Corporation, Darmstadt, Alemanha), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. O kit contém microesferas magnéticas fluorescentes recobertas por anticorpos de captura específicos para a IL-1 β . A reação foi lida no sistema de detecção de microesferas (Luminex 200TM, HTS, FLEXMAP 3DTM, Luminex Corporation, Austin, EUA), identificando o complexo antígeno-anticorpo a ela associado e a magnitude do sinal obtido pela estreptavidina conjugada com a proteína fluorescente Ficoeritrina (estreptavidina-PE), a qual é diretamente proporcional à quantidade de antígenos de interesse detectados. A concentração da IL-1 β foi estimada a partir de uma curva padrão. Um maior detalhamento da técnica de multiplex está contido no **APÊNDICE E**.

5.4.4 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram feitas utilizando-se o programa *GraphPad Prism* (versão 6.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método Shapiro-Wilk. A comparação das variáveis com distribuição não normal para três ou mais grupos foram feitas pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn., para dois ou três grupos, respectivamente, e expressas como mediana e intervalo interquartilico (IQ). Para a comparação das variáveis categóricas (polimorfismos) foi utilizado o teste do Qui-quadrado (χ^2) de Pearson assintótico. Foi utilizado o teste de Spearman, objetivando-se investigar a correlação entre os marcadores de função renal, marcadores inflamatórios e história prévia de rejeição. Foi considerado significativa as diferenças com o valor de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO

O presente estudo incluiu 173 pacientes submetidos ao transplante renal, sendo 104 do sexo masculino (60,11%) e 69 do sexo feminino (39,88%). Os principais dados clínicos e demográficos dos participantes deste estudo estão apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1 : Caracterização clínica e demográfica da população estudada

Paramêtros	Total (n: 173)
Sexo	
Masculino	104 (60,1%)
Feminino	69 (39,9%)
Idade	
18-34 anos	40 (23,1%)
35-49 anos	57 (32,9%)
50-64 anos	56 (32,3%)
≥65 anos	14 (8,09%)
Causa primária de DRC	
Glomerulopatias	55 (31,8%)
Nefrosclerose hipertensiva	24 (13,9%)
Doença renal do diabetes	15 (8,6%)
Outras causas	31 (17,9%)
Etiologias desconhecidas	31 (17,9%)
Não informado	15 (8,6%)
Comorbidades	
HAS	81 (46,8%)
DM	45 (26,0%)
ITU	12 (6,9%)
Outras	38 (21,9%)
Não tem/Não relatado	35 (20,2%)
Tipo de doador	
Falecido	94 (54,3%)
Vivo	65 (37,5%)
Indeterminado	14 (8,0%)
Imunossupressão	
TAC+MMF+PDN	94 (54,3%)
CSA+MMF+PDN	34 (19,6%)
Outras	27 (15,6%)
Indeterminado	16 (9,2%)

/continua

Terapia anti-hipertensiva

IECA	
β - bloqueadores	37 (21,3%)
Antagonista canal de Ca	51 (29,5%)
ARA	55 (31,8%)
Diuréticos	39 (22,5%)
	47 (27,1%)

DRC: doença renal crônica; HAS: hipertensão arterial sistêmica; DM: diabetes mellitus; ITU: infecção do trato urinário; TAC: tacrolimus, MMF: micofenolato mofetil, PDN: prednisona; CSA: ciclosporina; IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina; ARA: antagonistas dos receptores de angiotensina.

Considerando a comparação entre os sexos, o valor absoluto e percentual dos pacientes de sexo masculino (104-60,11%) foi maior do que das pacientes de sexo feminino (69-39,9%). As idades entre 35-49 anos (32,9%) e 50-64 (32,3%) foram predominantes no estudo (65,2%). Em relação às doenças primárias que culminaram no desenvolvimento da DRC, as glomerulopatias representaram a maior porcentagem da população total (31,8%), seguidas dos pacientes que não possuíam causas primárias de DRC definidas (17,9%) e da nefroesclerose hipertensiva (13,9%) relacionada à hipertensão arterial essencial. Para alguns pacientes (8,6%) não havia registro dessa informação em seus prontuários médicos, como mostra a **Tabela 1**.

No que diz respeito à presença de comorbidades no transplante renal, destaca-se como mais comum a HAS (46,8%) seguido de DM (26%), sendo a menos comum a infecção do trato urinário (6,9%). Cerca de 20,2% não apresentaram comorbidades ou não estava relatado em seus prontuários.

O doador falecido foi o tipo de doador mais frequente (54,3%), considerando-se como indeterminado aqueles que não possuíam este tipo de registro em prontuário (8,0%), como mostra a **Tabela 1**.

Relacionado à terapia de imunossupressão, a terapia tripla mais utilizada foi composta por Tacrolimus (TAC) + Prednisona (PDN) + Micofenolato Mofetil (MMF), representando 54,3% da população estudada. Além dos medicamentos para imunossupressão, todos os pacientes faziam uso de outros medicamentos. A maioria utilizava hipotensores, sendo os mais frequentes os antagonistas de canais de cálcio (31,8%), β - bloqueadores (29,5%) e IECA (21,3%) (**Tabela 1**).

6.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ECA EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL

O polimorfismo I/D no gene da ECA foi determinado em 173 pacientes transplantados renais, sendo classificados em três genótipos diferentes: DD (54-31,2%), ID (92-53,1%) e II (27- 15,6%).

Inicialmente, os pacientes foram distribuídos de acordo com os níveis de creatinina sérica (grupos C1 e C2) e as análises das frequências alélicas e genotípicas foram realizadas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos (C1 e C2), conforme demonstrado na **Tabela 2**.

Tabela 2- Frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina.

Alelo/Genótipo	C1 (n=92)	C2 (n=81)	p
D	106 (53,2%)	93 (46,7%)	0,922
I	78 (53,7%)	67 (46,2%)	
DD	28 (30,5%)	26 (32,0%)	0,920
ID	50 (54,3%)	42 (50,6%)	
II	14 (15,2%)	13 (16,0%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: creatinina \leq 1,4 mg/dL; C2: creatinina $>$ 1,4 mg/dL. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Posteriormente, os pacientes foram distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (R1 e R2). A **Tabela 3** mostra as análises das frequências alélicas e genotípicas. Não foram encontradas diferenças significativas entre os dois grupos (R1 e R2), conforme demonstrado.

Tabela 3- Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado.

Alelo/Genótipo	R1 (n=89)	R2 (n=84)	p
D	107 (53,5%)	93 (46,5%)	0,370
I	71 (48,6%)	75 (51,3%)	
DD	30 (33,7%)	24 (28,5%)	0,637
ID	47 (52,8%)	45 (53,5%)	
II	12 (13,4%)	15 (17,8%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico, os dados apresentados como valores absolutos (frequência em %); R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m² R2: eRFG < 60 mL/min/1,73m² Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Logo após, os pacientes foram distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (grupos NÃO REJ, REJ e INDET), não sendo demonstrada diferença entre os três grupos (**Tabela 4**).

Tabela 4- Frequências alélicas e genótípicas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto.

Alelo/Genótipo	NÃO REJ (n=78)	REJ (n= 60)	INDET (n=35)	p
D	88 (44%)	76 (38%)	36 (18%)	0,247
I	68 (46,5%)	44 (30,1%)	34 (23,2%)	
DD	22 (28,2%)	22 (36,6%)	10 (28,5%)	0,297
ID	44 (56,4%)	32 (53,3%)	16 (45,7%)	
II	12 (15,3%)	6 (10%)	9 (25,7%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

A comparação das frequências genótípicas foi novamente estudada entre os grupos utilizando, quando possível, os modelos de herança dominante e recessivo, uma vez que o padrão de herança genética destes polimorfismos não é totalmente

conhecido (**Tabela 5**). Os pacientes transplantados renais foram novamente distribuídos de acordo com os níveis de creatinina sérica (grupos C1 e C2). Não foram encontradas diferenças quanto às distribuições das frequências dos carreadores entre os grupos C1 e C2.

Tabela 5- Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com os níveis séricos de creatinina.

Genótipo	C1 (n=92)	C2 (n= 81)	p
Carreador D			
DD + ID	78 (84,7%)	68 (83,9%)	1,000
II	14 (15,2%)	13 (16,0%)	
Carreador I			
II + ID	65 (70,6%)	54 (66,6%)	0,742
DD	27(29,3%)	27 (33,3%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL; C2: creatinina $>1,4$ mg/dL. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Posteriormente os pacientes foram distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (grupos R1 e R2). A **Tabela 6** mostra as análises das frequências genotípicas referentes aos dois modelos de herança. Não foi demonstrada diferença significativa entre os grupos.

Tabela 6 – Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado

Genótipo	R1 (n=87)	R2 (n=86)	p
Carreador D			
DD + ID	75 (86,2%)	71 (82,5%)	0,536
II	12 (13,7%)	15 (17,4%)	
Carreador I			
II + ID	57 (74,7%)	62 (62,7%)	0,412

DD 30 (31,0%) 24 (31,3%)

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m²; R2: eRFG < 60 mL/min/1,73m². Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Os pacientes também foram distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição ao enxerto (grupos nãoREJ, REJ e INDET) e as mesmas análises foram realizadas (**Tabela 7**). Não foram encontradas diferenças significativas quanto às distribuições das frequências dos carreadores entre os grupos explicitados.

Tabela 7 – Distribuição genotípica segundo modelos dominante e recessivo em polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com a rejeição prévia ao enxerto.

Genótipo	NÃO REJ (n=78)	REJ (n= 60)	INDET (n=35)	p
Carreador D				
DD + ID	65 (83,3%)	52 (86,6%)	26 (74,2%)	0,299
II	13 (16,6%)	8 (13,3%)	9 (25,7%)	
Carreador I				
II + ID	57 (73,0%)	38 (63,3%)	25 (71,4%)	0,448
DD	21 (26,9%)	22 (36,6%)	10 (28,5%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico; os dados foram apresentados como valores absolutos (frequência em %); nãoREJ: não rejeição; REJ: rejeição; INDET: indeterminado. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Posteriormente, os pacientes foram avaliados em relação à presença ou ausência da doença hipertensiva pós-transplante, frente ao genótipo. A **Tabela 8** mostra as análises das frequências genotípicas e alélicas. Não foram encontradas diferenças entre os dois grupos (Presente, Ausente), conforme demonstrado.

Tabela 8- Avaliação do polimorfismo I/D da ECA em função da presença ou ausência da doença hipertensiva pós-transplante.

Alelo/Genótipo	Presente (n= 91)	Ausente (n= 82)	p
D	99 (49,5%)	101 (50,5%)	0,176
I	83 (56,8%)	63 (43,1%)	
DD	24 (26,3%)	30 (36,5%)	0,330
ID	51 (56,0%)	41 (50,0%)	
II	16 (17,5%)	11 (13,4%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico, os dados apresentados como valores absolutos (frequência em %). Presente: presença de doença hipertensiva; Ausente: ausência de doença hipertensiva. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Adicionalmente os pacientes foram distribuídos de acordo com o tipo de medicação imunossupressora. A **Tabela 9** mostra as análises das frequências genóticas. Não foram encontradas diferenças entre os três grupos (TAC, CSA e outros), conforme demonstrado.

Tabela 9- Frequências genóticas do polimorfismo I/D da ECA em receptores do transplante renal de acordo com tipo de medicação imunossupressora.

Genótipo	TAC	CSA	Outros	p
DD	28 (29,7%)	11 (32,3%)	14 (19,7%)	0,261
ID	55 (58,5%)	18 (52,9 %)	18 (41,8%)	
II	11 (11,7%)	5 (14,7%)	11 (25,5%)	

Teste Qui-Quadrado de Pearson Assintótico, os dados apresentados como valores absolutos (frequência em %). TAC: Tacrolimus, CSA: Ciclosporina. Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA 1 EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

6.3.1 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função da creatinina sérica, do eRFG , da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante.

A comparação dos níveis de IL-1 β foi feita em função das concentrações de creatinina (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL) conforme ilustrado na **Figura 3A**. Não foram obtidas diferenças comparando-se os dois grupos (mediana para C1=0,120 e C2=0,130, $p=0,309$). A avaliação dos níveis de IL-1 β também foi feita em função do eRFG (R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m² e R2 eRFG < 60 mL/min/1,73m²), como mostra a **Figura 3B** e não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar os grupos de eRFG (mediana para R1: 0,130 e R2: 0,130, $p= 0,904$). Na comparação entre os valores de IL-1 β e história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ: sem episódio de rejeição; REJ: rejeição prévia; INDET: rejeição indeterminada) não foram evidenciadas diferenças significativas **Figura 3C** (mediana nãoREJ: 0,130, REJ: 0,140, INDET: 0,120, $p= 0,185$).

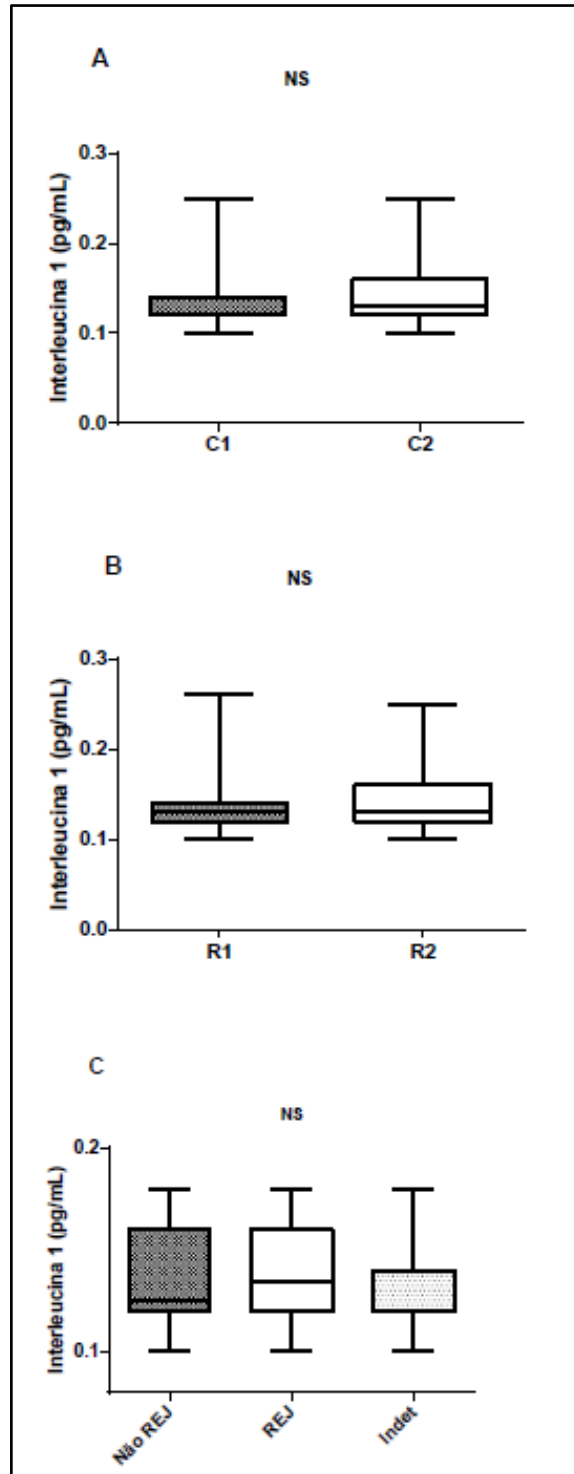


Figura 3 – Níveis séricos de IL 1 em diferentes grupos de pacientes transplantados renais. A: Pacientes distribuídos de acordo com a creatinina sérica (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL); **B:** pacientes distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1.73m² e R2 eRFG < 60 mL/min/1.73m²). **C:** pacientes distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição (Não Rejeição, Rejeição, Indet).

Indeterminado). Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn para três grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Para avaliar a influência do tempo pós-transplante sobre os níveis de IL-1 β , os pacientes foram distribuídos em quatro novos grupos, sendo eles T1: 1 a 24 meses; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses e T4: acima de 120 meses pós transplante (**Figura 4**). Foram observados maiores níveis de IL-1 β no grupo T1 em relação ao grupo T4 ($p < 0,0001$), no grupo T2 em relação ao grupo T3 ($p = 0,012$) e em relação ao grupo T4 ($p < 0,0001$) e menores níveis de IL-1 β no grupo T4 em relação ao grupo T3 ($p = 0,0002$).

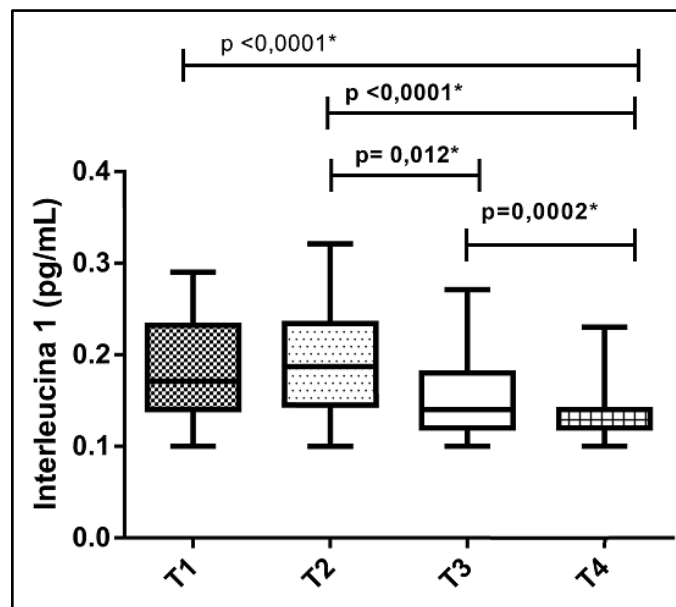


Figura 4 – Níveis séricos de IL 1 distribuídos em grupos de acordo com o tempo pós-transplante Pacientes distribuídos em função do tempo pós transplante (T1: 01 a 24 meses ; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: >120 meses pós transplante). Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn para três grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.3.2 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função dos polimorfismos da ECA

A fim de se avaliar a relação da IL-1 β com os polimorfismos da ECA e seus genótipos, foi realizada a comparação entre a concentração de IL-1 β nos pacientes

transplantados em função destes polimorfismos (**Figura 5**), não apresentando diferenças significativas ($p=0.346$).

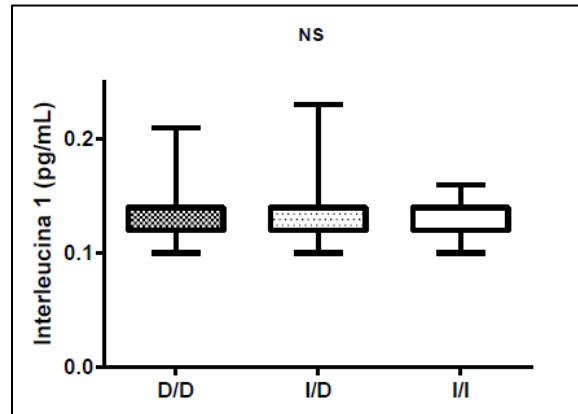


Figura 5 – Níveis séricos de interleucina 1 distribuídos em grupos de acordo com o genótipo (DD, ID e II). Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn, para três grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DO PLASMA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

6.4.1 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função da creatinina sérica, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante

A comparação dos níveis do perfil de oxidação do plasma foi feita em função das concentrações de creatinina (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL) conforme ilustrado na **Figura 6A**. Não foram obtidas diferenças comparando-se os dois grupos. (medianas para C1=0,232 e C2=0,237, $p=0,772$). A avaliação dos níveis do perfil de oxidação do plasma também foi feita em função do eRFG (R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1,73m² e R2 eRFG < 60 mL/min/1,73m²), como mostra a **Figura 6B** e não foram encontradas diferenças significativas ao se comparar os grupos de eRFG (medianas para R1= 0,232 e R2= 0,241, $p= 0,558$). Na comparação entre os valores MTT e história prévia de rejeição ao enxerto (nãoREJ: sem episódio de rejeição; REJ: rejeição prévia; INDET: rejeição indeterminada) não foram evidenciadas diferenças significativas, **Figura 6C** (medianas para nãoREJ:

0,232, REJ: 0,216, INDET: 0,224, $p=0,467$). Além disso, foi feita a comparação dos níveis do perfil de antioxidação do plasma em função do tempo pós transplante (T1: 01 a 24 meses ; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: >120 meses) **Figura 6D**, também não sendo encontradas diferenças significativas (medianas para T1: 0,232, T2: 0,232, T3: 0,243, T4: 0,244, $p= 0,351$) (**Figura 6**).

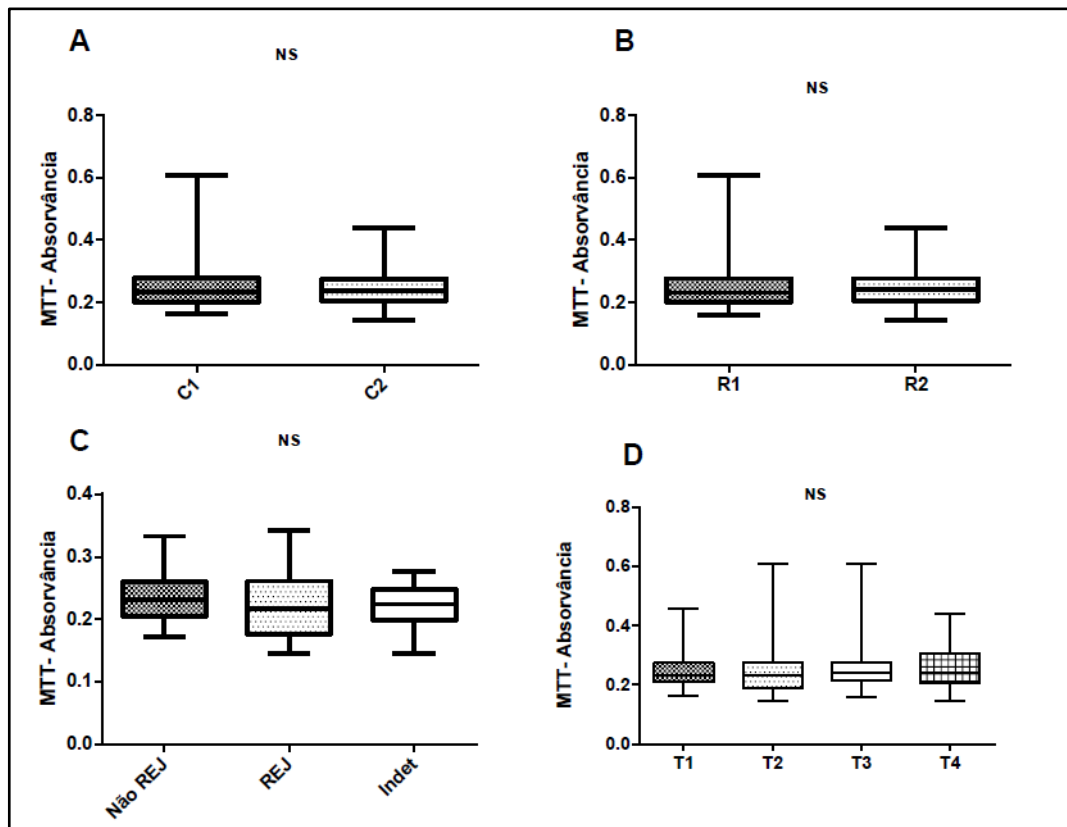


Figura 6 – Níveis séricos do perfil de antioxidação do plasma em diferentes grupos de pacientes transplantados renais. A: Pacientes distribuídos de acordo com a creatinina sérica (C1: creatinina $\leq 1,4$ mg/dL e C2: creatinina $> 1,4$ mg/dL); **B:** pacientes distribuídos de acordo com o ritmo de filtração glomerular estimado (R1: eRFG ≥ 60 mL/min/1.73m² e eR2 RFG < 60 mL/min/1.73m²). **C:** pacientes distribuídos de acordo com a história prévia de rejeição (Não Rejeição, Rejeição, Indeterminado) **D:** pacientes distribuídos em função do tempo pós transplante T1: 01 a 24 meses ; T2: 25 a 60 meses; T3: 61 a 120 meses; T4: >120 meses pós transplante. Teste de Mann-Whitney para dois grupos e Kruskal-Wallis para três grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.4.2 Avaliação do perfil antiantioxidante do plasma em função dos polimorfismos de ECA

A fim de avaliar a relação do perfil de antioxição do plasma com o polimorfismo I/D no gene da ECA, foi realizada a comparação entre a concentração do perfil de antioxição do plasma nos pacientes transplantados em função dos genótipos deste polimorfismo não apresentou diferença significativa (**Figura 7**),

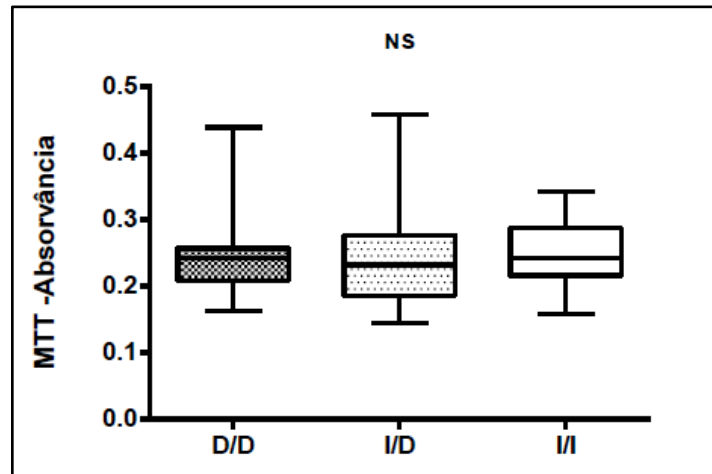


Figura 7 – Níveis séricos do perfil de antioxição do plasma distribuídos em grupos de acordo com o genótipo (DD, ID e II). Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Dunn, para três grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.5 AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

6.5.1 Avaliação das drogas anti-hipertensivas (IECA ou não IECA) em função da Interleucina-1 e o perfil de antioxição do plasma

Adicionalmente, os pacientes foram distribuídos de acordo com o tipo de medicação anti-hipertensiva (IECA e não IECA). A **Tabela 10** mostra as análises dos níveis de IL-1 e do perfil de antioxição do plasma, separados em dois grupos IECA e Não IECA. Foi encontrada uma maior mediana de MTT no grupo Não IECA em relação ao grupo IECA ($p < 0,0001^*$). As análises referentes à IL-1 não mostraram diferença significativa.

Tabela 10 – Análise das drogas anti-hipertensivas em receptores do transplante renal

Anti-hipertensivo	IECA (n=35)	Não IECA (n=116)	p
IL-1	0,120	0,140	0,387
MTT	0,170	0,233	<0,0001*

Teste de Mann-Whitney para dois grupos. O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS

Foi investigada uma possível correlação entre os parâmetros avaliados, conforme mostra a **Tabela 11**. Foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre os níveis de creatinina e a capacidade antioxidante do plasma avaliado pela redução do MTT, bem como foi encontrada uma correlação negativa e significativa entre o ensaio de MTT e o eRFG. Finalmente, foi encontrada uma correlação positiva e significativa entre o eRFG e o tempo pós-transplante. Entretanto, todas essas correlações significativas são de fraca magnitude.

Tabela 11 – Análise de correlação entre os parâmetros avaliados nos receptores do transplante renal

Parâmetros	r	p
Creatinina vs MTT	0,261	0,0006*
Creatinina vs IL 1	-0,046	0,569
Creatina vs tempo pós transplante	-0,103	0,178
eRFG vs MTT	-0,245	0,001*
eRFG vs IL1	-0,015	0,850
eRFG vs tempo pós transplante	0,153	0,045*
Tempo pós transplante vs MTT	0,094	0,419
Tempo pós transplante vs IL 1	0,079	0,329

Análise de correlação de Spearman. *Valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

7 DISCUSSÃO

7.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DOS INTEGRANTES DO ESTUDO

No presente estudo foram avaliados 173 pacientes transplantados renais, dos quais 104 eram do gênero masculino (60,1%) e 69 do gênero feminino (39,9%), demonstrando um predomínio do sexo masculino (**Tabela 1**). O que corrobora com os dados do censo de 2016 da Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN), onde 57% dos pacientes eram do sexo masculino (SESSO et al., 2016). Estudos de outros países também encontraram dados semelhantes com o predomínio de homens com DRC e transplantados renais (ARIAS-RODRÍGUEZ et al., 2015; HUANG et al., 2017).

Homens e mulheres apresentam sintomas e fisiopatologia distintos frente ao processo que culmina no transplante. As etiologias dessas diferenças podem estar associadas a questões sociais, hormonais e imunológicas (SANTIAGO et al., 2015).

As mulheres possuem como vantagem os hormônios sexuais femininos, como o estradiol, que pode conferir uma maior proteção renal e retardar o avanço da doença renal, quando comparado aos homens (SILBIGER; NEUGARTEN, 2008), o que pode explicar a menor necessidade e número de transplantes em pacientes do sexo feminino. Por outro lado, podem apresentar uma menor adesão ao tratamento, já que são mais propensas a terem que adaptar a vida familiar à sua doença. Apresentam mais associações depressivas e ansiedade, podendo ser traduzido em um estresse crônico e um maior risco de complicações (COBO et al., 2016).

Contribuindo com estes dados, estudos demonstraram que as mulheres em uso de hemodiálise e que estão à espera de um transplante são mais afetadas que os homens nos parâmetros de qualidade de vida relacionados com saúde e apresentam maior incômodo diante dos sintomas da insuficiência renal do que os homens (LOPES et al., 2007).

De maneira complementar ao estudo de gênero, o corrente estudo apresentou as faixas etárias compreendidas entre 35-49 anos (32,9%) e 50-64 (32,3%) como predominantes no estudo (65,2%), ratificando os resultados encontrados no Registro Brasileiro de Transplantes (RBT) de 2018, onde os pacientes entre 35-49 anos (27%) e 50-64 (35%) foram predominantes. O que representa um dado social significativo já

que atinge uma população em plena idade economicamente ativa (BARBOSA et al., 2006).

No presente estudo, as glomerulopatias (31,8%) e a nefrosclerose hipertensiva (13,9%) foram as principais causas primárias da DRC, correspondendo a 45,7%. Entretanto, 35,8% não apresentavam etiologia definida ou não estava relatada nos prontuários médicos. Contrariamente, um estudo comparativo entre o perfil epidemiológico da América Latina e da Europa demonstrou uma maior prevalência de DM como causa primária de DRC, e um menor índice relacionado a glomerulopatia na América Latina comparado à Europa, o que possibilitou aos autores inferirem que a glomerulopatia na América Latina pode estar subestimada devido a um encaminhamento tardio aos nefrologistas, o que limitaria a realização de uma biópsia renal e a categorização correta da doença renal primária (LUXARDO et al., 2018).

A HA (46,8%) e o DM (26%) foram demonstradas como as principais comorbidades associadas à população deste estudo, dado que vai de encontro ao trabalho feito por Romagnani et al., 2017, que relata a prevalência da DM e da HA como as doenças subjacentes mais comuns. Do número total do estudo, em 42,1% dos pacientes as comorbidades associadas não estavam relatadas em seus prontuários, o que denota uma necessidade crescente de melhoria nos registros da equipe médica. Cabe ressaltar que tanto o DM quanto a HA podem ser a causa ou a consequência do transplante renal, não sendo possível diferenciá-las neste estudo (ANDERSEN et al., 2004). O DM e a HA, sejam pré ou pós-transplante, podem levar a uma menor sobrevida dos receptores do transplante renal, especialmente relacionados a complicações cardiovasculares (GOLDMANNOVA et al., 2016; DIVAC et al., 2017).

Em concordância com as principais comorbidades, o DM está entre as doenças não transmissíveis relacionadas como importante fator e risco para DRC. Estudos revelaram que nas pessoas com DM, a prevalência de DRC estimada é de 30-40% (JHA et al., 2013). O DM pré-transplante acentua o declínio na função do enxerto e apresenta um maior risco de rejeição aguda (EIDE et al., 2017).

Critérios de diagnóstico para DM pós-transplante, fatores de risco como obesidade, idade, genética, tratamento com imunossupressão, bem como a fisiopatologia, foram avaliados em estudos recentes, demonstrando que é essencial o conhecimento desses riscos, uma vez que eles ajudarão no manejo proativo e

multidisciplinar, podendo levar a uma melhor função do enxerto a longo prazo (GOLDMANNOVA et al., 2016; LANGSFORD; STEINBERG; DWYER, 2017) .

Os doadores falecidos foram o tipo mais prevalente de doadores no estudo (54,3%) o que vai de encontro as informações da ABTO (2018) onde a maior parte dos transplantes realizados no Brasil foi proveniente de doadores falecidos, totalizando 4.905 (ABTO, 2018).

As terapias imunossupressoras utilizadas nos pacientes transplantados renais podem estar associadas ao aparecimento de DM e HA pós-transplante, porém em um estudo realizado por Sharif e colaboradores (2017), não se recomenda a escolha de um medicamento específico apenas com base no risco de se desenvolver a DM.

Diversos estudos compararam as drogas imunossupressoras TAC e CSA, pilares centrais da imunossupressão atual, mas nenhum apresentou um resultado consistente, relacionado à indicação ou preferência por uma droga ou outra (KRAMER et al., 2016; JUNIOR et al., 2015; LIU et al., 2016). No presente estudo foi evidenciado um maior valor percentual de pacientes em uso da tríade imunossupressora TAC (inibidor de calcineurina) + MMF (agente antiproliferativo) + PDN (corticoesteróide).

Corroborando com este achado, em um estudo de metanálise foi possível verificar que o TAC é uma droga eficaz e segura que reduz o risco de morte após o transplante, reduzindo também a perda do enxerto, o risco de rejeição aguda e a hipercolesterolemia, demonstrando melhor custo benefício do que a CSA. No entanto, apresenta uma tendência ao aparecimento de DM recente após transplante (LIU et al., 2016). Contrariamente, alguns estudos apontam para benefícios semelhantes relacionados a sobrevida do enxerto, tanto com o uso de TAC quanto de CSA (GONWA et al., 2003; MEIER-KRIESCHE; KAPLAN, 2002; WOODWARD et al., 2005).

Os inibidores de calcineurina, TAC e CSA, também podem causar alterações nos vasos como o aumento do tônus, disfunção do endotélio e aumentam a retenção de sódio através do SRA, culminando na HA nos pacientes em uso desses medicamentos (ROSSI et al., 2015). Cerca de 60 a 90% dos pacientes transplantados renais apresentam HA pós-transplante, o que pode afetar diretamente a disfunção crônica do enxerto e a sobrevida do transplante (VILLANEGO et al., 2017).

A fim de controlar a HA são utilizadas medicações anti-hipertensivas, sendo que neste estudo as medicações antagonistas de canal de Ca^{2+} (31,8%), β

bloqueadores (29,5%), Diuréticos (27,1%), ARA (22,5%) e IECA (21,3%) foram utilizadas pelos pacientes transplantados renais, o que vai de encontro as diretrizes estipuladas pelo KDOQI 2017 (*Kidney Disease Outcomes Quality Initiative*), sobre hipertensão e agentes anti-hipertensivos, que estabelece essas drogas como as mais relevantes para o uso nos pacientes transplantados renais (KRAMER et al., 2019).

Em um estudo, os IECA foram as drogas mais utilizadas em pacientes na fase pré-transplante e de forma conjugada a outra anti-hipertensivo na fase pós-transplante. As medicações β bloqueadoras e antagonistas de canal de Ca^{2+} foram mais predominantes na fase pós-transplante, sendo que neste estudo não foi possível identificar e/ou classificar o momento em que a droga anti-hipertensiva foi introduzida. Em contrapartida, um estudo de Premassathian, 2004 demonstrou que os antagonistas de canal de Ca^{2+} estavam presentes em um maior grupo de pacientes pós-transplante. Os IECA passam a serem usados com maior frequência após os anos 2000, sendo considerados ideais para uso em pacientes com doença renal.

7.2 DETERMINAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DO POLIMORFISMO I/D NO GENE DA ECA EM RECEPTORES DO TRANSPLANTE RENAL

A ECA está diretamente associada à homeostase cardiovascular. O polimorfismo I/D no gene *ECA* podem modular geneticamente a expressão da enzima. Cerca de 50% da variabilidade interindividual do nível circulante de ECA e de sua atividade em um organismo saudável está associada à presença destes polimorfismos, sendo que o alelo D está associado aos altos níveis plasmáticos de ECA e tem como consequência fisiológica aumento dos níveis circulantes de ANG II (VILLAR et al., 2007). Assim, os polimorfismos que regulam todo o SRA podem ser considerados como mediadores muito importantes no desfecho do transplante renal, sendo fundamentais na determinação do prognóstico do enxerto renal (AKÇAI et al., 2003).

Nos últimos anos diversos estudos foram realizados na tentativa de evidenciar a associação do polimorfismo I/D no gene *ECA* com as doenças renais (FAWWAZ et al., 2017; MANSOURI et al., 2017; SHAIKH et al., 2014), tendo em vista que genes que regulam a ECA e outras enzimas do SRA, em receptores de transplante renal, podem afetar a função renal como um fator independente (SLOWINSKI et al., 2004).

Dentre os 173 pacientes avaliados no estudo, observamos um predomínio de pacientes com genótipo I/D (n=92, 53,1%), seguido do genótipo DD (n=54, 31,2%) e do genótipo II (n=27, 15,6%), o que concorda com outro estudo realizado no Brasil sobre a frequência genotípica deste polimorfismo, onde foi relatada o predomínio dos pacientes com genótipo I/D (INÁCIO; FILHO; VIEIRA, 2004).

Neste estudo, não pôde ser sustentado a relação do polimorfismo I/D no gene da ECA e a alteração na função renal, bem como sua correlação com a rejeição ao enxerto em pacientes transplantados renais, não apresentando nenhuma diferença significativa entre os grupos (**Tabela 2, Tabela 3, Tabela 4**). Quanto à função renal, isso está de acordo com outro estudo que também não conseguiu provar que o polimorfismo I/D no gene da ECA seja um fator prognóstico independente para a função renal (KABAT-KOPERSKA et al., 2004).

Além disso, ainda de forma concordante, uma metanálise não encontrou associação do polimorfismo I/D da ECA com os níveis de creatinina sérica e a taxa de filtração glomerular (CARNING et al., 2015).

Corroborando com a não significância dos dados de história prévia de rejeição no presente estudo, Slowinski e colaboradores (2004), relataram que o polimorfismo I/D no gene da ECA não apresentaram relação com fatores que predizem a disfunção do enxerto ou ocorrências de episódios de rejeição.

Ademais, Azmandiam e colaboradores (2015) não conseguiram demonstrar a associação significativa entre os genótipos da ECA e a rejeição, sugerindo assim que o polimorfismo I/D do gene *ECA* do doador e do receptor poderiam não ser preditores do risco de rejeição.

Contrariamente, Viklický e colaboradores (2012), demonstraram uma possível associação dos genótipos da ECA, principalmente o genótipo DD, a uma função do enxerto satisfatória, onde os pacientes com este genótipo apresentaram melhor performance da creatinina comparado aos outros genótipos.

Adicionalmente e de forma distinta ao nosso estudo, Kabat-Koperska e colaboradores (2004), demonstraram que os pacientes com o genótipo II que não estavam em uso de IECA tinham concentrações significativamente maiores de creatinina, quando comparadas aos outros genótipos. Porém, nos pacientes com o genótipo II que estavam em uso de IECA, a concentração de creatinina foi normal, demonstrando assim o benefício da medicação.

Ademais, Akçay e colaboradores (2003), relataram que pacientes com genótipo DD apresentaram uma pior função crônica do enxerto no grupo de pacientes avaliados.

Ainda de forma contrária aos resultados encontrados no corrente estudo, a pesquisa de Huang e colaboradores (2015) demonstrou uma associação do polimorfismo I/D da ECA com a rejeição ao enxerto renal.

Assim, ainda é discutível a associação entre o polimorfismo I/D no gene ECA e a função e alterações histológicas do enxerto renal, especialmente porque estudos de polimorfismos exigem um “n” amostral muito grande, o que dificulta ainda mais tais achados (YANG et al., 2015; HUANG et al., 2015).

7.3 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA 1 EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

7.3.1 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função da creatinina sérica, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto e do tempo pós-transplante.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na comparação dos níveis de IL-1 em função das concentrações de creatinina, do eRFG e da história prévia de rejeição ao enxerto (**Figura 3A, 3B, 3C**, respectivamente).

A avaliação dos níveis da IL-1, especificamente, em associação à função renal e aos fatores de rejeição em pacientes transplantados renais, permanece pouco explorada na literatura demonstrando, assim, a necessidade de se investir no estudo deste biomarcador inflamatório tão importante para o transplante renal.

De forma distinta aos resultados encontrados no presente estudo, Caban e colaboradores (2009) demonstraram um nível sérico elevado de IL-1 em pacientes com função renal diminuída após o transplante em comparação a pacientes com boa função renal após a transplantação. Tal fato pode estar relacionado às células polimorfonucleares e monócitos de pacientes com rejeição que secretam mais IL-1 do que pacientes com não rejeição ou pacientes com biópsia de enxerto normal demonstrando, assim, uma possível relação entre a IL-1 e a rejeição (MULDERS et al., 2017).

Adicionalmente, um estudo realizado por Teppo e colaboradores (1998), demonstrou altas concentrações de IL-1 e creatinina em receptores do transplante renal com rejeição quando comparados aos pacientes sem histórico de rejeição.

Em um estudo com modelo animal, foi observado um aumento significativo de IL-1 nos camundongos após o procedimento de transplante, não sendo possível demonstrar se o aumento da citocina esteve relacionado diretamente ao transplante ou se estava associado ao processo inflamatório gerado pelo ato cirúrgico (SECHER et al., 2014).

Cabe ressaltar que diante da importância das interleucinas no transplante renal, outras interleucinas têm sido associadas à função renal e rejeição do transplante, como no estudo realizado por Kwiatkowska e colaboradores (2017), que avaliaram se a interleucina 8 (IL-8) era um bom marcador de função do enxerto, sugerindo que um alto nível urinário de IL-8 após o transplante seria um marcador precoce da disfunção do enxerto e de longo prazo, sendo também negativamente correlacionado ao RFG avaliado no período inicial pós-transplante.

Sonkar e colaboradores (2013) apresentaram em seu estudo um aumento significativo de IL-6 e TNF no grupo de receptores do transplante renal que apresentavam rejeição.

De forma complementar, Budak e colaboradores (2015) encontraram uma correlação negativa entre TNF e o eRFG nos pacientes pós-transplante. Além disso, Mazanowska e colaboradores (2013) associaram negativamente em seu estudo a relação do eRFG com os níveis urinários de IL-6 nos receptores de transplante renal.

No presente estudo, foram encontradas diferenças significativas na comparação dos níveis de IL-1 em função do tempo pós-transplante (**Figura 4**).

Um estudo demonstrou que os níveis de IL-1 β (HUNG et al., 2011) e de outras citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, o TNF e a IL-8, estavam significativamente mais elevados em pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise regular quando comparados aos do grupo controle representado por indivíduos saudáveis (RYSZ et al., 2006). No presente estudo, os níveis de citocinas não foram dosados antes da realização do transplante, porém cerca de 19% dos pacientes avaliados fizeram hemodiálise antes do procedimento cirúrgico. De fato, assim como o processo de transplantação renal, a hemodiálise gera um processo inflamatório intenso o que aumenta o risco de morbidade e mortalidade destes pacientes (ONCEL et al., 2016; MANDIC et al., 2017).

Além disso, outro estudo foi parcialmente concordante aos nossos achados ao demonstrar uma redução significativa de biomarcadores pró-inflamatórios aos 6

meses de transplante renal, seguida de uma elevação destes marcadores em um ano e um ano e meio após o transplante (CUETO-MANZANO et al., 2005).

Um estudo de Mota e colaboradores (2013) se mostrou discordante aos resultados encontrados no presente estudo ao verificar uma tendência à elevação de níveis de IL-1 β após 120 meses de transplante. Nessa pesquisa foram avaliados pacientes transplantados renais de dois centros de transplante de Belo Horizonte, incluindo o centro estudado no corrente estudo. Os autores explicaram este fato pelo descuido frequente do uso da imunossupressão pelos pacientes após um maior tempo de transplante.

Ainda de maneira distinta, Simmons e colaboradores (2005), observaram uma redução significativa dos marcadores inflamatórios no período de pós transplante recente indicando uma diminuição do processo inflamatório com a restauração da função renal após o transplante.

Sabe-se que a tolerância imunológica pode ser adquirida pelos pacientes no transplante. Tal fato pode explicar o tempo pós-transplante a longo prazo encontrado em nosso estudo. Em um estudo realizado por LU e ZANG (2016), foi relatado que a tolerância imunológica pode acontecer em alguns casos, onde os receptores tornam-se tolerantes ao enxerto e mantêm uma função estável do mesmo, configurando uma tolerância imunológica espontânea.

Sabe-se que a avaliação de perfis inflamatórios no pós-transplante imediato e tardio tem sido de grande interesse para a pesquisa e para a prática clínica, uma vez que tais biomarcadores poderiam se tornar promissoras ferramentas de monitoramento dos pacientes transplantados renais. Outras avaliações futuras, considerando, talvez, um maior número de pacientes ou diferentes critérios de seleção da amostra, poderiam nos auxiliar na obtenção de achados significativos.

7.3.2 Avaliação dos níveis de interleucina 1 em função do polimorfismo I/D da ECA

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na comparação dos níveis de IL-1 em função do polimorfismo I/D da ECA (**Figura 5**). Atribuímos a este fato a uma possível interferência das medicações anti-hipertensivas utilizadas pelos pacientes deste estudo, como a IECA e BRA, já que essas

medicações tendem interferir na produção de citocinas pró-inflamatórias (GENCTOY et al, 2005).

Além disso, o uso de medicação imunossupressora no transplante renal, como os inibidores de calcineurina, suprimem a produção de citocinas, o que poderia também interferir nos níveis da IL-1 (SEYHUN et al., 2015).

Na literatura, estudos da relação entre IL-1 e o polimorfismo I/D da ECA em pacientes transplantados renais ainda são raros, porém pesquisadores tem trabalhado esta relação em diversas doenças renais e até mesmo em outras patologias, tentando sempre demonstrar o advento dos fatores não modificáveis (genéticos) como importantes biomarcadores para diagnóstico e monitoramento das doenças (NE et al., 2017; KYUNG-HWAN et al., 2002).

Ne e colaboradores (2017), estudaram o papel do polimorfismo I/D da ECA e da IL-1 em pacientes com DRC e anemia, eritropoetina hiporresponsivos, onde observaram que o alelo D afetou positivamente o nível sérico da ECA. Além disso, ao comparar o efeito do polimorfismo da ECA nos níveis de eritropoetina, o estudo verificou que os pacientes com genótipo DD tiveram valores de eritropoetina bem menores em relação aos demais genótipos. A pesquisa sugeriu que a triagem dos genótipos dos pacientes ainda no pré-tratamento pode ajudar a prever quais pacientes estão em risco ou serão mau respondedores ao tratamento, uma vez que o polimorfismo no gene da ECA tem um papel importante na determinação da resposta à eritropoetina e progressão da DRC.

De forma semelhante, Jeong e colaboradores (2008), constataram que os pacientes com genótipo DD apresentaram valores de eritropoetina significativamente menores em comparação aos pacientes com genótipo ID e II. Assim, os autores demonstraram que possuir o genótipo DD diminui a necessidade do medicamento eritropoetina, devido ao nível relativamente alto de ANG II. Além disso, mostraram que a inflamação é um dos principais preditores independentes da resistência à terapia com eritropoetina com participação importante das citocinas pró-inflamatórias com destaque para a IL-1. Esta tem sido demonstrada como um inibidor de eritropoiese por suprimir a formação de colônias de progenitores eritroides da médula óssea e, por consequência, inibir a produção de eritropoetina.

Além dos estudos realizados associando a IL-1 ao polimorfismo I/D da ECA, outras importantes citocinas associadas às doenças renais ou a outras patologias têm sido avaliadas em associação ao polimorfismo I/D da ECA.

Este é o caso do estudo realizado por Genctoy e colaboradores (2005), que relata uma correlação positiva e significativa entre os níveis séricos da ECA com o TNF e a IL-6. Os autores indicaram os efeitos importantes do SRA, mais especificamente da ANG II, na produção de citocinas inflamatórias em pacientes renais. Em relação à genética, não encontraram correlação entre o polimorfismo I/D no gene da ECA e as citocinas avaliadas, sugerindo que outros estudos sejam realizados, a fim de fornecer informações para a prevenção de complicações inflamatórias.

7.4 AVALIAÇÃO DO PERFIL ANTIOXIDANTE DO PLASMA EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

7.4.1 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função da creatinina sérica, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto em RTR e do tempo pós-transplante.

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na comparação dos níveis do perfil antioxidante no plasma em função das concentrações de creatinina, do eRFG, da história prévia de rejeição ao enxerto e do tempo pós-transplante (**Figura 6A, 6B, 6C e 6D**, respectivamente).

Espera-se que com o transplante renal e o restabelecimento das funções renais haja melhora nos índices de estresse oxidativo, com decréscimo destes, uma vez que as condições de diálise pré-transplante e a própria DRC aumentam os níveis de EROs nesses indivíduos.

De forma semelhante, um estudo demonstrou uma boa e gradual evolução da função renal após transplante, acompanhado da melhora dos índices de estresse oxidativo, devido às alterações favoráveis no eRFG dos pacientes estudados, tendo em vista que a melhora na filtração glomerular elimina os solutos tóxicos que contribuem para a formação de EROs (MARINHO; ROMÃO; CHIARELLO, 2017).

De forma adicional, Cottone e colaboradores (2006) relacionaram o aumento do estresse oxidativo a um estado inflamatório em receptores do enxerto renal de acordo com o tempo pós-transplante a longo prazo. Salienta-se que neste estudo foram excluídos pacientes tabagistas, com DM e história prévia de doenças

cardiovasculares, o que traria de fato uma maior tendência a elevação do estresse oxidativo e alteração dos marcadores de função de renal.

Um dos grandes desafios associados ao estresse oxidativo é a manutenção do equilíbrio deste com os fatores antioxidantes, em favor da homeostase. Chen e colaboradores (2011) estudaram um mecanismo de proteção do rim contra o estresse oxidativo e o processo inflamatório em animais, já que a EROs exercem efeitos tóxicos durante a isquemia/reperfusão. Neste estudo, foi utilizado células tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e os autores demonstraram que esta terapia minimizou o dano renal após isquemia/reperfusão, suprimindo o estresse oxidativo e a resposta inflamatória nos animais avaliados.

7.4.2 Avaliação do perfil antioxidante do plasma em função dos polimorfismos de ECA

No presente estudo, não foram encontradas diferenças significativas na comparação do perfil antioxidante em função do polimorfismo I/D da ECA (**Figura 7**).

Os estudos na literatura quanto ao estresse oxidativo em função do polimorfismo I/D no gene da ECA de pacientes transplantados renais ainda são escassos.

Em um estudo encontrado neste sentido, foi avaliado a associação do polimorfismo I/D da ECA com o estresse oxidativo em tecidos renais de camundongos com nefropatia diabética. Foram encontradas diferenças entre os genótipos, sendo as alterações mais relevantes associadas ao genótipo DD com potencialização das respostas inflamatórias, danos renais e oxidativos. Além disso, a terapia com IECA reduziu significativamente o estresse oxidativo (ZOU et al., 2017).

Neste contexto, Cobas (2009) avaliou pacientes com diabetes tipo I quando a presença do polimorfismo I/D do gene da ECA e o componente essencial para ativação da NADPH oxidase. Não sendo encontrada diferença significativa entre os alelos D e I da ECA tanto no grupo doente quanto no controle. O polimorfismo não apresentou associação com a presença de nefropatia, retinopatia e HA. Desta forma concluíram que na população estudada a frequência do polimorfismo e do stress oxidativo não apresentou diferenças em pacientes diabéticos.

A relação do polimorfismo I/D e o perfil antioxidante do plasma, tem sido avaliado em outras patologias que não renais, como é o caso do estudo realizado por Gonzalez-Garrido e colaboradores (2017), onde avaliaram a associação do

polimorfismo I/D, obesidade e dano oxidativo na pré-eclâmpsia. Foi possível observar que a frequência do genótipo DD foi maior nas pacientes com pré-eclâmpsia quando comparadas às pacientes com gestações normais. Adicionalmente neste estudo, correlacionaram o dano oxidativo à redução na atividade do sistema antioxidante das pacientes com pré-eclâmpsia.

7.5 AVALIAÇÃO DAS DROGAS ANTI-HIPERTENSIVAS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS

7.5.1 Avaliação das drogas anti-hipertensivas (IECA ou não IECA) em função do perfil antioxidante do plasma

Em nosso estudo foi possível observar um valor significativo entre o perfil de antioxidação do plasma e os grupos IECA e não IECA (**Tabela 10**).

De maneira semelhante, um estudo realizado por Ghorbanihaghjo e colaboradores (2008) avaliou o efeito da medição IECA e da ARAs em um grupo de pacientes, e constatou uma redução do estresse oxidativo no grupo que fazia uso das respectivas medicações.

Nakamura e colaboradores (2013) demonstraram que a terapia combinada IECA e BRA pode ser benéfica por meio de seus efeitos renoprotetores, anti-inflamatórios e anti-oxidantes. A superestimulação do SRA com a liberação acentuada de ANGII tem por consequência um aumento da inflamação concomitantemente ao aumento do estresse oxidativo que podem ser inibidos por IECA e BRA.

Em um experimento com modelo animal, foi demonstrado uma diminuição da concentração de marcadores de estresse oxidativo e um aumento da atividade antioxidante (MIKRUT et al., 2016). Além disso, em outro estudo com animais hipertensos, os autores puderam demonstrar o papel protetor da IECA na lesão induzida por hipertensão, bem como sua função em diminuir o estresse oxidativo e aumentar o nível de antioxidantes (YUSOFF, 2017)

De forma adicional, Calò e colaboradores (2002) puderam identificar um aumento do estresse oxidativo nos pacientes transplantados renais que faziam uso de CSA, o que poderia conduzir a uma HA e/ou rejeição ao enxerto renal. Foi constatado também que o uso de IECA nos pacientes deste estudo normalizou a PA e reduziu o estresse oxidativo.

Sugere-se então que a possível redução do estresse oxidativo durante o transplante renal merece mais atenção com a investigação de potenciais biomarcadores. Isto seria um possível caminho para personalizar o tratamento de pacientes transplantados renais, ao detectar precocemente as lesões subclínicas do enxerto relacionadas à hipertensão (ARGANI et al, 2008)

7.6 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO ENTRE OS PARÂMETROS AVALIADOS

No corrente estudo, a creatinina se correlacionou positivamente com a capacidade antioxidante. Ademais, foi encontrado uma correlação negativa da capacidade antioxidante com o eRFG e uma correlação positiva entre eRFG e o tempo pós-transplante (**Tabela 11**).

Assim como neste estudo, outros autores encontraram uma correlação positiva entre a diminuição nos níveis de creatinina, com recuperação gradual da função renal, e os biomarcadores do estresse oxidativo pós-transplante. Ainda neste estudo, porém de forma distinta, foi demonstrada uma correlação positiva entre o eRFG e a capacidade antioxidante (MARINHO; ROMÃO; CHIARELLO, 2017).

Park e colaboradores (2013) relataram uma associação positiva entre uma melhor função do enxerto renal avaliada pelo eRFG e a sobrevida do paciente ao longo do primeiro ano pós-transplante.

De forma distinta ao nosso estudo, Mota e colaboradores (2015) relacionaram de forma negativa o RFG com o tempo pós transplante em receptores do transplante renal que receberam rins de doadores com critério estendido quando comparado com os doadores padrão.

8 CONCLUSÕES

Foram encontrados menores níveis da IL-1 no grupo com maior tempo pós-transplante, o que pode indicar uma redução do processo inflamatório com tolerância imunológica ao enxerto.

Uma maior capacidade antioxidante foi observada nos pacientes que não utilizavam os inibidores da enzima conversora da angiotensina, demonstrando uma possível tentativa de contrabalancear um possível aumento de inflamação e ERRO nesse grupo.

O perfil antioxidante do plasma e a função renal foram correlacionados nos pacientes transplantados renais avaliados. Foi possível observar que a piora ou melhora da função de filtração do enxerto está diretamente relacionada a um aumento ou diminuição, de forma respectiva, da capacidade antioxidante.

As análises genéticas não demonstraram diferenças significativas quanto aos padrões avaliados.

Estudos futuros com um aumento do número amostral e com um acompanhamento longitudinal dos pacientes transplantados renais são necessários para uma melhor compreensão dos mecanismos inflamatórios relacionados a perda do enxerto.

9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO

Correlacionar todos os biomarcadores trabalhados nos outros estudos, pertencentes ao projeto geral, a fim de correlacioná-los e verificar se existe alguma influência destas correlações na função renal e na rejeição ao enxerto

Coletar novas amostras, com objetivo de avaliar todos os pacientes que são atendidos pelo Hospital das Clínicas da UFMG no ambulatório de transplante, a fim de aumentar o nosso n amostral e possibilitar uma melhor avaliação dos diversos polimorfismos já trabalhados pelo grupo. Mediante a coleta dessas novas amostras, trabalhar com os marcadores anti-inflamatórios, realizando coletas seriadas no período pré e pós-transplante, a fim de avaliar a função do enxerto renal.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2015.
- ABREU, et al. Determination of antioxidante status of plasma from type 2 diabetic patients ecaluation. **Diabetes Res Clin Pract**, p. 193-107, 2007.
- ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, [S.l.: s.n.], 2018.
- AKDIS et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n.3, p. 721-812, 2011.
- ANTLANGER, et al. Molecular remodeling of the renin-angiotensin system after kidney transplantation. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.18, n.2, 2017.
- ARGANI, et al. Effects of losartan and enalapril on high-sensitivity C-reactive protein and total antioxidant in renal transplant recipients with Renin-Angiotensin system polymorphisms. **Transplant Proc**, v.40, n.1, p.16-21, 2008.
- ARIAS-RODRÍGUEZ, et al. Prevalence and clinical characteristics of renal transplant patients with true resistant hypertension. **J Hypertens**, v.33, n.5, 2015.
- AKÇAY, et al. Angiotensin-converting enzyme genotype is a predictive ator in the peak panel-reactive antibody response. **Transplant Proc**, v.36, n.1, p. 35-37, 2004.
- AZARFAR, et al. Comparação de tacrolimus e ciclosporina para imunossupressão após transplante renal: Uma revisão sistemática atualizada e meta-análise. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, p. 1376-1385, 2018.
- AZIS, F. et al. Hypertension guidelines: How do they apply to kidney transplant recipients. **Transplant Rev.**, p. 225-233, 2018.
- AZMANDIAN, et al. Study of the association between the donors and recipients angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and the acute renal allograft rejection. **J Nephrothol**, v.4, n.3, p.62-68, 2015.
- BALASUBRAMANIAN, et al. Candidate gene polymorphisms in solid câncer. **Eur J Surg Oncol**. v.30, n.6, p. 593-601, 2004.

BALAKUMAR, et al. Renin-angiotensin-aldosterone: Na inclusive, na invigorative, na interactive and na interminable system. **Pharmacol Res**, p. 1-3, 2017.

BARBOSA, et al. Co-morbidade e mortalidade de pacientes em início de diálise. **Acta Paul Enferm**, v.19, n.3, 2006.

BARBOSA, et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev Nutri**, v.23, n.4, 2010.

BENT, et al. Interleukin-1 Beta-A Friend or Foe in Malignancies? **Int J Mol Sci**, v.24, n.19, 2018.

BHAT, et al. Association of IL1 beta gene polymorphism and allograft functions in renal transplant recipients :a case control study from Kashmir Valley. **BMC Nephrol**, v. 18, n. 1, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. Diretrizes Clínicas para o Cuidado ao paciente com Doença Renal Crônica – DRC no Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Especializada e Temática. – Brasília: Ministério da Saúde, 2014. p.: 37

BURBALLA, C. et al. MDRD o CKD-EPI en la estimación del filtrado glomerular del donante renal vivo. **Revista de la Sociedad Española de Nefrología.**, v.32, p. 109-246, 2018.

BURNS, K.D. The emerging role of angiotensin-converting enzyme-2 in the kidney. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.16, n.2, p. 116-121, 2007.

CABAN, et al. Fatores determinantes das alterações nas concentrações de marcadores pró-inflamatórios no soro sanguíneo no período inicial após o transplante renal de doador morto. **Ann Transplante**, v.14, p. 10-13, 2009.

CALLAGHAN, C. J .; BRADLEY, J. A. Current status of renal transplantation. **Methods Mol Bio**, p. 1-28, 2006.

CALÒ, et al. Oxidative stress in kidney transplant patients with calcineurin inhibitor-induced hypertension: effect of ramipril. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.40, n.4, 2002.

CARGNIN, ET AL. Impact of recipient ACE I/D genotype on kidney function in renal transplant patients: a meta-analysis of cross-sectional and longitudinal studies. **Pharmacogenomics**, v. 16, n. 16, p. 1887-1902, 2015.

CARMICHAEL, et al. Evaluation of a tetrazolium semi-automatic colorimetric assay: evaluation of radiosensitivity. **Cancer Res**, v.47, n.4, 1987.

CHAPPEL, M.C. Nonclassical renin-angiotensin system and renal function. **Compr Physiol**, v.2, n.4, p. 2733-2752, 2012.

CARVALHO, A. C. V.; DOMINGUETI, C.P. Papel das citocinas inflamatórias na nefropatia diabética. **Rev Soc Bras Clin Med**, v.14, n.3, 2016.

CHANDRAN, et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. **Am J Transplant**, v.17, n. 11, p. 2945-2954, 2017.

CHOWDHURY, P.; HERNANDEZ-FUENTES, M.P. Non-invasive biomarkers to guide management following renal transplantation: the need for a multiplatform approach. **Curr Opin Organ Transplant**, v.18, p. 01- 05, 2013.

COBAS, et al. **Polimorfismos I/D do gene da enzima conversora de angiotensina e C242T do gene do componente p22phox do NADPH oxidase em pacientes com diabetes tipo I**. 2009. 82f. Dissertação (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

COBO, et al. Sex and gender differences in chronic kidney disease: progression to end-stage renal disease and haemodialysis. **Clin Sci**, v.30, n.14, p. 1147-1163, 2016.

COTTONE, et al. Estresse oxidativo e inflamação em hipertensos transplantados renais a longo prazo. **Clin Nephrol**, v. 66, p. 32-38, 2006.

COZZI, E.; COLPO, A.; SILVESTRO, G. The mechanisms of rejection in solid organ transplantation. **Transfus Apher Sci**, v. 56, n. 4, p. 498-505, 2017.

CHEN, et al. Adipose-derived mesenchymal stem cell protects kidneys against ischemia-reperfusion injury through suppressing oxidative stress and inflammatory reaction. **J Transl Med**, v.9, n.51, 2011.

CUETO-MANZANO, A. M. et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. **Transplantation**, v. 80, n. 1, p. 47-51, 2005.

DAVIS, S.; COOPER, J. E. Acute antibody-mediated rejection in renal transplant recipients. **Transplant Ver**, v. 31, n. 1, 2017.

DIVAC, et al. Patterns of antihypertensive medication use in kidney transplant recipients. **Herz**, v.42, n.1, 2017.

EIDE, et al. Associations Between Posttransplantation Diabetes Mellitus and Renal Graft Survival. **Transplantation**, v.101, n.6, 2017.

EROL, A. et al. Evaluation of TH17 and TH1 Immune Response Profile in Patients After Renal Transplant. **Transplant Proc.**, p. 467-471, 2017.

ESPINEL, et al. Angiotensin-converting enzyme i/d polymorphism in patients with malignant hypertension. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v.7, n.1, p. 11-15, 2005.

FAWWAZ, et al. Association between angiotensin-converting enzyme insertion/deletion gene polymorphism and end-stage renal disease in lebanese patients with diabetic nephropathy. **Saudi J Kidney Dis Transpl**, v.28, n.2, 2017.

FERREIRA, et al. Infectious complications as the leading cause of death after kidney transplantation: analysis of more than 10,000 transplants from a single center. **J Nephrol**, v. 30, n. 4, p. 601-606, 2017.

GARGIULO, R.; SUHAIL, F.; LERMA, E.V. Hipertensão e doença renal crônica. **Dis Mon**, v.61, p. 387-395, 2015.

GREENLAND, P.; PETERSON, E. The new 2017 ACC/AHA Guidelines “Up the Pressure” on diagnosis and treatment of hypertension. **JAMA**, p. 2083-2084, 2017.

GHORBANIHAGHIO, et al. Prevention of DNA damage in renal transplantation by losartan and enalapril: the role of renin-angiotensin system polymorphisms. **Clin Exp Nephrol**, v.12, n.1, 2008.

GOLDMANNOVA, et al. New-onset diabetes mellitus after renal transplantation. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repu**, v.160, n.2, p. 195-200, 2016.

GONWA, et al. Randomized trial of tacrolimus + mycophenolate mofetil or azathioprine versus cyclosporine + mycophenolate mofetil after cadaveric kidney transplantation: results at three years. **Transplantation**, v.75, n.12, 2003.

GONZALEZ- GARRIDO, et al. Preeclampsia is associated with ACE I/D polymorphism, obesity and oxidative damage in Mexican women. **Pregnancy Hypertens**. v.10, p 22-27, 2017.

HAN, et al. Relationship of renin- angiotensin system polymorphisms with ambulatory and central blood pressure in patients with hypertension. **J Clin Hypertens**, n.19, p. 1081-1087, 2017.

HAMRAHIAN S. M., FALKNER B. Hypertension in Chronic Kidney Disease. **Adv Exp Med Biol.**, p. 307-352,2017.

HU .H.; KNETCHLE S. J. Elevation of multiple cytokines/chemokines in urine of human renal transplant recipients with acute and chronic injuries: potential usage for diagnosis and monitoring. **Transpl Rev**, p. 165- 171, 2006.

HUANG, et al. Association between angiotensin I converting enzyme Insertion/Deletion polymorphism and prognosis of kidney transplantation: A meta-analysis. **PloS One**, v.10, n.5, 2015.

HUANG, et al. Understanding trends in kidney function 1 year after kidney transplant in the United States. **J Am Soc Nephrol**, v. 28, n. 8, 2017.

HUISING, et al. A evolução molecular da família interleucina- 1 de citocinas; IL- 18 em peixe teleost. **Dev Comp Immunol**, v.28, n. 5, 2004.

HUNG, et al. IL-1 β receptor antagonist reduces inflammation in hemodialysis patients. **J Am Soc Nephrol**, v.22, n.3, p.437-442, 2011.

INÁCIO, J.; FILHO, L.R.; VIEIRA, G.S. Genotypic and allelic frequencies of I/D polymorphism of ACE gene in the Brazilian Population. **J Biosci**, v.20, n.1, p.47-51, 2004.

ISRANI, A.K. Association of hypertension genotype and decline in renal function after kidney transplantation **Transplantation**, v.84, n.10, p. 1240-1247.

JEONG, et al. Polymorphisms in two genes, IL-1B and ACE, are associated with erythropoietin resistance in Korean patients on maintenance hemodialysis. *Exp Mol Med*, v.40, n.2, 2008.

JHA, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**, 2013.

Jl, L.D. Are genetic polymorphisms in the renin-angiotensin aldosterone system associated with essential hypertension? Evidence from genome-wide association studies. **J Hum Hypertens**, v.31, n.11, p.695-698, 2017.

JINFENG, L. et al. Donor kidney glomerular filtration rate and donor/recipient body surface area ratio influence graft function in living related kidney transplantation. **Journal Renal Failure.**, v.37, p. 576-581, 2015.

JHA, et al. Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**, p. 260-272, 2013.

JOYCE-THAN, et al. Renin-Angiotensin System Gene Variants and Type 2 Diabetes Mellitus: Influence of Angiotensinogen. **J Diabetes Res**, 2016.

JUNIOR, et al. Ciclosporina versus tacrolimus: análise de custo-efetividade para o transplante renal no Brasil. **Rev Saúde Pub**, 2015.

KABAT-KOPERSKA, et al. The influence of angiotensin-converting enzyme gene of donor and recipient on the function of transplanted kidney. **Transplant Proc**, v.37, n.2, p. 755-759, 2005.

KAKUTA, Y. et al. Assessment of renal function in living kidney donors before and after nephrectomy: A Japanese prospective, observational cohort study. **International Journal of Urology.**, v.26, p 499-505, 2019.

KRAMER, et al. Efficacy and safety of tacrolimus compared with ciclosporin-A in renal transplantation: 7-year observational results. **Transplant Int**, p. 307-314, 2016.

KIRSZTAJN, et al. Leitura rápida do KDIGO 2012: Diretrizes para avaliação e manejo da doença renal crônica na prática clínica. **J Bras Nefrol**, v.36, n.1, p.63-73, 2013.

KRAMER, et al. KDOQI US Commentary on the 2017 ACC/AHA Hypertension Guideline. **Am J Kidney Dis**, v.73, n.4, p. 437-458, 2019.

KRATA, et al. Oxidative Stress in Kidney Diseases: The Cause or the Consequence? **Arch Immunol Ther Exp**, v.66, n.3, 2018.

KUNIKULLAYA U. K., ANANTHAKRISHNAN V., GOTURU, J. Robert Tigerstedt and the discovery of renin - a revisit. **Int J Cardiol.**, v.158, p. 1-5, 2012.

LA RUSSA, et al. Oxidative imbalance and kidney damage in spontaneously hypertensive rats: activation of extrinsic apoptotic pathways. **Cli Sci**, v.131, n.13, p. 1419-1428, 2017.

LANGSFORD, D.; STEINBERG, A.; DWYER, K.M. Diabetes Mellitus Following Renal Transplantation: Clinical and Pharmacological Considerations for the Elderly Patient. **Drugs Aging**, v.34, n.8, p. 589-601, 2017.

LEE, et al. Influence of recipient and donor IL-1alpha, IL-4, and TNFalpha genotypes on the incidence of acute renal allograft rejection. **J Clin Pathol**, v.57, n.1, 2004.

LEVEY, A.; INKER, L. A.; CORESH, J. Estimation og GFR: from physiology to public health. **Am J Kidney Dis**. p. 820-834, 2014.

LOPES, et al. Qualidade de vida relacionada à saúde de pacientes renais crônicos em diálise. **Acta Paul Enferm**, v.27, n.3, 2014.

LIM, M. A.; KOHLI, J.; BLOOM, R. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going? **Transplant Rev**, v. 31, n. 1, p. 10-17, 2017.

LIU, et al. Tacrolimus Versus Cyclosporine as Primary Immunosuppressant After Renal Transplantation: A Meta-Analysis and Economics Evaluation. **Am J Ther**, v.23, n.3, 2016.

LU, J.; ZHANG, X. Immunological characteristics of renal transplant tolerance in humans. **Mol Immunol**, v.77, p.71-78, 2016.

LUXARDO, et al. The epidemiology of renal replacement therapy in two different parts of the world: the Latin American Dialysis and Transplant Registry versus the European

Renal Association-European Dialysis and Transplant Association Registry. **Rev Panam Salud Publica**. p. 42-87, 2018.

MALHOTRA, et al. Blood Pressure, CKD Progression, and Kidney Allograft Failure in Kidney Transplant Recipients: A Secondary Analysis of the FAVORIT Trial. **Sou J Hipertens**, 2019.

MAILLARD, N.; DELANAVE, P.; MARIAT, C. Exploração da função glomerular renal: estimativa da taxa de filtração glomerular. **Nephrol Ther**, v. 11, n.1, 2015.

MANSOURI, et al. Associations between clinical characteristics and angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in Moroccan population with Type-2 diabetic nephropathy. **J Kidney Dis Transpl**. v.28, n.2, 2017.

MHAMED, et al. La ponction biopsie rénale: indications, complications et résultats. **Pan Afr Med**, v.20, p. 31-44, 2018.

MANDIC, et al. Body Composition and Inflammation in Hemodialysis Patients. **Ther Apher Dial**, v.21, n.6, p.556-564, 2017.

MARINHO, L.V.; ROMÃO, E.A.; CHIARELLO, P.G. Estado nutricional, gasto energético e estresse oxidativo protéico após o transplante renal. **Redox Rep**, v.22, p. 439-444, 2017.

MEIER-KRIESCHE, H. U.; KAPLAN, B. Cyclosporine microemulsion and tacrolimus are associated with decreased chronic allograft failure and improved long-term graft survival as compared with sandimmune. **Am J Transplant**, v. 2, n. 1, 2002.

MEIER-KRIESCHE, et al. Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era. **Sou J Transplant**, v.4, n.3, 2004.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doação de Órgãos: transplantes, lista de espera e como ser doador. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doacao-de-orgaos>>. Acesso em: 14 mar. 2019.

MIKRUT, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors reduce oxidative stress intensity in hyperglycemic conditions in rats independently from bradykinin receptor inhibitors. *Croat Med*, v.57, n.4, 2016.

MOECKLI, et al. Avaliação de rins de doadores antes do transplante: uma atualização dos métodos atuais e emergentes. **Transpl Int**, p. 459-469, 2019.

MOROZUMI, K. et al. Reviewing the pathogenesis of antibody-mediated rejection and renal graft pathology after kidney transplantation. **Nephrology.**, p. 4-8, 2016.

MOTA, A. P. L. et al. Cytokines signatures in short and long-term stable renal transplanted patients, v. 62, n. 2, p. 302-309, 2013.

MOTA A. P. L. et al., Hemostatic parameters according to renal function and time after transplantation in Brazilian renal transplanted patients. **Dis. Markers**, v. 2015, p. 472750, 2015.

MULDERS, et al. Peri- and Postoperative Treatment with the Interleukin-1 Receptor Antagonist Anakinra Is Safe in Patients Undergoing Renal Transplantation: Case Series and Review of the Literature. **Front Pharmacol**, v.31, p. 338-342, 2017.

MOMBELLI, et al. Comparação entre a creatinina CKD-EPI e as equações MDRD para estimar a taxa de filtração glomerular em pacientes transplantados renais. **Transplant Proc**, v.48, n. 2, 2016.

MUCHA K.; FORONCEWICZ B.; PAÇZEK L. How to diagnose and follow patients with glomerulonephritis without kidney biopsy? *Pol Arch Med Wewn*, v.18, n.126, 2016.

NAKAMURA, et al. Combination therapy with an angiotensin-converting-enzyme inhibitor and an angiotensin II receptor antagonist ameliorates microinflammation and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig*, v.4, n.2, 2003.

NAZARI, et al. Comparison of the Th1, IFN- γ secreting cells and FoxP3 expression between patients with stable graft function and acute rejection post kidney transplantation. *Irã J Allergy Asthma Immunol*, v. 12, n. 3, 2013.

ONCEL, et al. Cytokines, adipocytokines and inflammatory markers in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis and hemodialysis. *Ren Fail*, v.77, p.71-78, 2016.

ORTIZ-MELO D. I.; GURLEY S.B. Angiotensin converting enzyme 2 and the kidney. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. v.25, n.1, p.59-66, 2016.

OSTROWSKI, ET AL. Pro- and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. *J.Physiol*. p. 287–291, 1999.

PALOMO, et al. The interleukin (IL)-1 cytokine family--Balance between agonists and antagonists in inflammatory diseases. *Cytokine*, v.76, n.1, 2015.

PHILLIPS M. L., SCHMIDT-OTT K., M. The Discovery of Renin 100 Years Ago. *News Physiol Sci*, v.14, p. 271-274, 1999.

PREMASSATHIAN, et al. Blood pressure control in kidney transplantation: therapeutic implications. *J Hum Hypertens*, v.18, n.2, 2004.

RIBEIRO, J. M. Inibidores da enzima conversora da angiotensina e bloqueadores de receptores da angiotensina II no tratamento da hipertensão arterial. *Rev. Bras. Hipertens.*, v.5, p. 69-72, 2003.

RIGATTO K. V., BOHLKE M., IRIGOYEN M. C. Sistema renina angiotensina: da fisiologia ao tratamento. *Rev Soc Cardiol do Rio Grande do Sul*, v.3, p.1-5, 2004.

RIGAT, B. et al. An Insertion/Deletion Polymorphism in the Angiotensin I-converting Enzyme Gene Accounting for Half the Variance of Serum Enzyme Levels. **J Clin Invest.** v. 86, n.4, p. 1346-1346, 1990.

RYSZ, et al. Blood sérum levels of IL-2, IL-6, IL-8, TNF-alpha and IL-1beta in patients on maintenance hemodialysis. **Cel Mol Immunol**, v.3, n.2, 2006.

ROSSI, et al. Hypertension, living kidney donors, and transplantation: where are we today? **Adv Chronic Kidney Dis**, v.22, n.2, 2015.

SA, H.; LEAL, R.; ROSA, M. Renal transplantation Immunology in the last 20 years: A revolution towards graft and patient survival improvement. **International Reviews of Immunology.**, v.36, p 182-203, 2017.

SADEGHI, et al. Pre-transplant Th1 and post-transplant Th2 cytokine patterns are associated with early acute rejection in renal transplant recipients.

Clin Transplant, v. 17, n. 2, 2003.

SHARIF, et al. Proceedings from an international consensus meeting on posttransplantation diabetes mellitus: recommendations and future directions. **Am J Transplant**, v.14, n.9, p. 1992-2000, 2017.

SALVADORI. M.; TSALOUCHOS, A. Biomarkers in renal transplantation: An updated review. **Word J Transplant**, p. 161-178, 2017.

SANJULIANI, A.F. Eixo Renina-Angiotensina-Aldosterona: Bases Fisiológicas E Fisiopatológicas. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto, Uerj.**, v.10, n. 3, 2011.

SANTIAGO, et al. Prevalence and clinical characteristics of renal transplant patients with true resistant hypertension. **Rev Saúde Pública**, p. 49-68, 2015.

SATOU, R.; PENROSE, H.; NAVAR, L.G. Inflammation as a Regulator of the Renin-Angiotensin System and Blood Pressure. **Curr Hypertens Rep**, v.20, n. 12, p.100, 2018.

SAYER G., BHAT. G. The renin-angiotensin-aldosterone system and heart failure. **Cardiol Clin.**, p. 21-32, 2014.

SHAIKH, et al. Genetic variants of ACE (Insertion/Deletion) and AGT (M268T) genes in patients with diabetes and nephropathy. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.15, n.2, 2014.

SECHER, et al. No effect of remote ischaemic conditioning on inflammation in a porcine kidney transplantation model. **Transplant Immunol**, v.31, n.2, 2014.

SESSO, et al. Brazilian Chronic Dialysis Survey 2016. **J Bras Nefrol**, v. 39, n. 3, p. 261-266, 2017.

SHRESTHA, B.; HAYLOR, J.; RAFTERY, A. Perspectivas históricas no transplante renal : uma revisão atualizada . **Prog Transplant**, v. 25, p. 64-69, 2015.

SHIPCOVA, M. WIELAND, E. Editorial: Immune monitoring in solid organ transplantation. **Clin. Biochem**, p. 317-349, 2016.

SIGDEL, T. K, SARWAL, M.M. Moving beyond HLA: a review of nHLA antibodies in organ transplantation. **Hum Immunol**, v. 74, n. 11, p. 1486-1490, 2013.

SIMMONS, E. M. et al. Effect of Renal Transplantation on Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in End-Stage Renal Disease Patients. **Transplantation**, v. 79, n. 8, p. 914–919, 2005.

SLOWINSKY, et al. No association between renin-angiotensin system gene polymorphisms and early and long-term allograft dysfunction in kidney transplant recipients. **Nephrol Dial Transplant**, v.19, n.11, p. 2846-2851, 2004.

SPARKS, et al. Classical Renin-Angiotensin System in Kidney Physiology. *Compr Physiol*, v.4, n.3, p. 1201-1228, 2014.

STEVENS, et al. Evaluation of the modification of diet in renal disease study equation in a large diverse population. **J Am Soc Nephrol**, v. 18, n. 10, 2007.

SILBIGER. S.; NEUGARTEN. J. Gender and human chronic renal disease. **Gend Med**, 2008.

TAAL, MW: Angiotensin-converting enzyme gene polymorphisms in renal disease: Clinically relevant? **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.9, p. 651–657, 2000.

TEPPO, et al. Does increased urinary interleukin-1 receptor antagonist/interleukin-1beta ratio indicate good prognosis in renal transplant recipients? **Transplantation**, v.66, p. 1009-1014, 1998.

TERRITO, et al. Robotic kidney transplantation: current status and future perspectives. **Minerva Urol Nefrol**, v. 69, n. 1, p. 05-13, 2017.

TREVISI, et al. Inhibition of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) endocytosis by ouabain in human endothelial cells. **FEBS Letters**, p.2769-2773, 2006.

THOMAS, B.; TABER, D.J.; SRINIVAS, T. R. Hipertensão após transplante renal: uma abordagem fisiopatológica. **Curr Hypertens Rep**, p. 458-469, 2013.

THOMPSON & THOMPSON. *Genética Médica – 6° edição*. Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, RJ. 2002.

VILLAR, et al. Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism is not associated with susceptibility and outcome in sepsis and acute respiratory distress syndrome. **Intensive Care Med**, v. 488-495, 2008.

VIAZZI, F.; LEONCINI, L.; PONTREMOLI, R. Tratamento anti-hipertensivo e proteção renal: o papel dos medicamentos inibidores do sistema renina-angiotensina-aldosterona. **High Blood Press Cardiovasc Anterior**, v. 20, p. 273-282, 2013.

VILLANEGO, et al. Changes in Antihypertensive Therapy After Renal Transplantation. **Transplant Proc**, v.50, n.2, 2018.

VIKLICKÝ, et al. ACE gene polymorphism and long-term renal graft function. **Clin Biochem**.v.34, n.1, p-87-90, 2012.

WERMELT, J.A.; SCHUNKERT, H. Manejo da hipertensão arterial. **Herz**, v. 42, p. 515-526, 2017.

WOODWARD, et al. Renal graft survival and calcineurin inhibitor. **Transplantation**, v.15, n.80, 2005.

YANG, et al. Assessment of the relationship between ACE I/D gene polymorphism and renal allograft survival. **J Renin Angiotensin Aldosterone Syst**, v.13, p. 813-819, 2015.

YUSOFF, et al. Effect of Antihypertensive Drug Treatment on Oxidative Stress Markers in Heart of Spontaneously Hypertensive Rat Models. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**, v.36, n.1, 2017.

ZANG, et al. The Gene Variants of Maternal/Fetal Renin-Angiotensin System in Preeclampsia: A Hybrid Case-Parent/Mother-Control Study. **Sci Rep**, v.11, n.7, 2017.

ZHAO, R.; ZHOU, H.; SU, S. B. A critical role for interleukin-1 β in the progression of autoimmune diseases. **Int Immunopharmacol**, v.17, n.3, 2013.

ŽIVKOVIĆ, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms as risk factors for multiple sclerosis. **J Neurol Sci**, v.363, p. 29-32, 2016.

ZHOU, et al. Conceptual and methodological issues relevant to cytokine and inflammatory marker measurements in clinical research. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care**, v.13, n.5, 2010.

ZOU, et al. Relationship of angiotensin I-converting enzyme (ACE) and bradykinin B2 receptor (BDKRB2) polymorphism with diabetic nephropathy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* v.1863, n.6, 2017.

WEIR, M.R. Assessment and management of hypertension in transplant patients. **J Am Soc. Nephrol.**, p. 1248-1260, 2015.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE (2015)



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

Projeto: CAAE – 48473415.0.0000.5149

**Interessado(a): Profa. Ana Paula Lucas Mota
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia**

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de setembro de 2015, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores genéticos no transplante renal"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

**Prof. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz
Coordenadora do COEP-UFMG**

ANEXO B – Carta de aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, CAAE (Atualizada em 2016).



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

Projeto: CAAE – 48443715.3.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Ana Paula Lucas Mota**
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 30 de agosto de 2016, a emenda abaixo relacionada, do projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação de marcadores genéticos, inflamatórios e hemostáticos no transplante renal"** .

- Acréscimo de novos biomarcadores de diagnóstico e monitoramento dos pacientes transplantados, sem perdas ou alterações em seus tratamentos.

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

Prof. Dra. Vivian Resende
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
(Grupo de Pacientes Transplantados Renais)

Título do Projeto: Associação de níveis e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados

Professora orientadora e pesquisadora responsável:
Dra. Ana Paula Lucas Mota

Você está sendo convidado a participar como voluntário(a) de uma pesquisa científica intitulada como: “Associação de níveis e polimorfismos em genes de citocinas com a função renal de pacientes transplantados”, que está descrita a seguir:

A perda do enxerto por mecanismos diversos de rejeição e a ocorrência de complicações cardiovasculares ainda são frequentes no pós-transplante renal. A inflamação, a ativação do sistema imunológico, os distúrbios da coagulação e características genéticas desempenham um papel importante em pacientes transplantados renais, principalmente no que diz respeito à mortalidade cardiovascular e ao risco de rejeição. Na década de 1960, os transplantes de órgãos foram iniciados no Brasil, mas não evoluíram naquela época, em razão da baixa sobrevida dos receptores. Atualmente, com o aprimoramento de técnicas científicas, o Brasil detém o maior programa público de transplantes de órgãos e tecidos do mundo, destacando-se pelo crescente número de transplantes realizados a cada ano.

Esta pesquisa visa esclarecer sobre as alterações laboratoriais em exames de pacientes transplantados renais, que possam contribuir para o melhor tratamento e monitoramento pós-transplante. Você está sendo convidado para participar desta pesquisa de forma **voluntária e gratuita**.

Para decidir se você deve concordar ou não em participar desta pesquisa, leia atentamente todos os itens a seguir que irão informá-lo(a) e esclarecê-lo(a) de todos os procedimentos, riscos e benefícios pelos quais você passará segundo as exigências da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

1. Identificação do(a) voluntário(a) da pesquisa:

Nome: _____ Gênero: _____
 Identidade: _____ Órgão Expedidor: _____
 Data de Nascimento: ____/____/____ Médico: _____
 Telefone: _____ Tempo de Tx: _____

2. Objetivo da pesquisa:

Investigar os polimorfismos em genes de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras e os níveis de citocinas em pacientes submetidos ao transplante de rim, sem sinais clínicos de rejeição, distribuídos em subgrupos de acordo com os níveis séricos de creatinina e o ritmo de filtração glomerular estimado.

3. Descrição detalhada e explicação dos procedimentos realizados:

Sua participação é voluntária e se dará por meio de uma punção venosa de amostras sanguíneas, com agulhas estéreis e descartáveis e tubos a vácuo, também estéreis. Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa envolvem possíveis incômodos durante a punção venosa, como dor local, tonteira ou sensação de desmaio e, após a coleta, o possível surgimento de uma mancha roxa (hematoma), devido ao extravasamento de sangue de um vaso sanguíneo. Geralmente não há complicações e essa mancha roxa desaparece em poucos dias.

Descrição dos desconfortos e riscos da pesquisa:

(X) Risco Mínimo () Risco Baixo () Risco Médio () Risco Alto

4. Descrição dos benefícios da pesquisa:

Se você aceitar participar, estará contribuindo para a confirmação ou a exclusão das hipóteses geradas em torno das alterações em exames laboratoriais encontrados em pacientes transplantados renais, bem como irá contribuir para a geração de materiais didáticos, que possuem o objetivo de instruir e esclarecer os participantes sobre o tratamento e a prevenção de diversas complicações associadas ao transplante de rim.

5. Despesas, compensações e indenizações:

Você não terá despesa pessoal nessa pesquisa incluindo transporte, exames e consultas. As coletas serão realizadas sempre que você comparecer às consultas de rotina e/ou ao laboratório para exames. Você não terá compensação financeira relacionada à sua participação nessa pesquisa.

6. Direito de confidencialidade:

Você tem assegurado que todas as suas informações pessoais obtidas durante a pesquisa serão consideradas estritamente confidenciais e os registros estarão disponíveis apenas para os pesquisadores envolvidos no estudo. Os resultados obtidos nessa pesquisa poderão ser publicados com fins científicos, mas sua identidade será mantida em sigilo.

7. Acesso aos resultados da pesquisa:

Você tem direito de acesso atualizado aos resultados da pesquisa. Em caso de resultados que possam afetar seu monitoramento, entraremos em contato com você ou com o seu médico para que as devidas medidas possam ser tomadas.

8. Liberdade de retirada do consentimento:

Você tem direito de retirar seu consentimento, a qualquer momento, deixando de participar da pesquisa, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu cuidado e/ou tratamento na instituição.

9. Acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca de procedimentos, riscos, benefícios, etc., através dos contatos abaixo:

Professora orientadora e responsável pela pesquisa: Ana Paula Lucas Mota
Telefone: (31) 3409 6896
Email: aplmeta@farmacia.ufmg.br

10. Acesso à instituição responsável pela pesquisa:

Você tem garantido o acesso, em qualquer etapa da pesquisa, à instituição responsável pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas acerca dos procedimentos éticos, através do contato abaixo:

Comitê de ética do campus da UFMG
Avenida Antônio Carlos, 6627, Unidade Administrativa II – 2º andar, sala 2005,
Campus Pampulha, Belo Horizonte, MG. CEP: 31270-901. Telefone (31) 3409
4592.
email coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE B – Ficha Clínica

Ficha Clínica			
"AVALIAÇÃO DE MARCADORES GENÉTICOS, INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS"			
Número de ID do participante: _____ Data da coleta: ____ \ ____ \ ____ Prontuário: _____			
1. Identificação:			
Nome: _____		DN: ____ \ ____ \ ____ Sexo: _____	
Naturalidade: _____		Endereço: _____	
Cidade: _____		Estado: _____ CEP: _____ Tel: _____	
Etnia: _____		Médico: _____ Outras Infos: _____	
2. Dados Clínicos:			
a) Peso (Kg): _____		Altura (m) _____	
		IMC (Kg/m ²) _____	
c) Doença base: _____		b) Diálise/Tempo: _____	
		d) Comorbidades: _____	
e) Data do Tx renal: ____ \ ____ \ ____		f) Doador (tipo/idade/sexo): _____ \ _____ \ _____	
g) Imunossuppressores: _____			
h) Outros medicamentos: _____			

i) Tabagismo? _____ j) Consumo de bebida álcool? _____			
k) Prática de exercício físico? _____ l) Tipo sanguíneo: _____ m) História familiar de DRC: _____			
n) PA: ____ \ ____ o) Rejeição prévia\data indução: _____			
Dados Laboratoriais - Data: ____ \ ____ \ ____			
Hemograma	Ionograma	Bioquímica	Bioquímica
Hem/Hb: ____ \ ____	Na/K: ____ \ ____	Creat: _____	BDL BT: ____ \ ____
GL: _____	Mg/P/Cl: ____ \ ____ \ ____	Uréia: _____	Nível Med. _____:
Seg/Bast: ____ \ ____	Ca/CaI: ____ \ ____	Ác. Úrico: _____	Albumina: _____
Baso/Eos: ____ \ ____	Urina	HbA1c: _____	Globina: _____
Linf/Mono: ____ \ ____	DU/pH: ____ \ ____	Glico JJ: _____	LDH: _____
Plaq: _____	Micro/Prot: ____ \ ____	TG/FAST: _____	Colest T: _____
VCM/HCM: ____ \ ____	Prot. 24h: _____	TGPALT: _____	HDL/LDL: ____ \ ____
PTTA: c: ____ \ p: ____	Alb/Creat: _____	FALGGT: ____ \ ____	VLDL/TGL: _____
RN/TP: ____ \ c: ____ \ p: ____	Sedimento: _____	CK T: _____	Outros: _____
Outros: _____	Outros: _____	Outros: _____	Outros: _____
Imuno (Receptor)		Imuno (Doador)	
HLA A: _____	B: _____	DR: _____	HLA A: _____
			B: _____
			DR: _____
PRA PRÉ (data): _____		Prova Cruzada: _____	GS: _____
PRA PÓS (data): _____		Outros: _____	
Biópsia: _____		Infecções pós-Tx: _____	
Outros: _____			

APÊNDICE C – Detalhamento da extração do DNA pelo kit Biopur Mini Spin

A proteinase K foi previamente preparada com a adição de 1,35mL de Tampão de Proteinase e o Tampão de Eluição S foi pré-aquecido a 56°C. Foi realizada a transferência de 200µL de sangue total de cada paciente para microtubos de centrifugação de 1,5mL. Em cada microtubo contendo sangue total foram adicionados 25µL de Proteinase K seguido da adição de 200µL de tampão de Lise S. Após a adição dos reagentes, os microtubos foram homogeneizados vigorosamente em vórtex para a obtenção de um alto rendimento e pureza de DNA. Os microtubos foram incubados a 56°C por 15 minutos e, a cada 5 minutos desta etapa, foram novamente homogeneizados em vórtex. Para a precipitação do DNA, foram adicionados 210µL de etanol 99,8% nos microtubos. O conteúdo de cada microtubo foi transferido para o Tubo Spin S e centrifugado por 1 minuto a 11.000 RPM. O tubo de coleta com o filtrado foi descartado e o tubo-filtro foi colocado sob um novo tubo de coleta. Posteriormente, foram adicionados 500µL de Tampão de Lavagem SI e os Tubos Spin S foram centrifugados por 1 minuto a 11.000 RPM. O filtrado foi descartado e o tubo de coleta foi recolocado sob o tubo-filtro. Para remover o etanol residual, foi realizada a centrifugação por 1 minuto a 11.000 RPM. O tubo-filtro foi colocado em um tubo de Eluição S e foram dispensados 200µL de Tampão de Eluição S previamente aquecido diretamente sobre a membrana de sílica do tubo-filtro. Os tubos de Eluição S foram incubados por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugados por 1 minuto a 11.000 RPM.

APÊNDICE D – Detalhamento da quantificação de IL-1 β por Multiplex

Para a realização do teste, foram adicionados 200 μ L de tampão de ensaio em cada poço da placa. A placa foi selada e colocada sob agitação por 10 minutos em temperatura ambiente. O tampão de ensaio foi removido por inversão da placa em papel toalha limpo. Foram adicionados 13 μ L de amostra padrão e amostra controle nos poços apropriados e 13 μ L de tampão de ensaio nos poços correspondentes às amostras teste. Posteriormente, foram adicionados 13 μ L da solução matriz em todos os poços da placa e 13 μ L de cada amostra de soro (diluição 1:2) em seus respectivos poços. Após a adição das beads (13 μ L), a placa foi selada e incubada por 2 horas com agitação em temperatura ambiente. Esse passo permitiu que anticorpos específicos localizados na superfície das beads “capturassem” seus respectivos antígenos presentes nas amostras de soro garantindo a sua detecção simultânea. O conteúdo dos poços foi retirado por inversão e a placa foi lavada 3 vezes com 200 μ L de tampão de lavagem. Em cada poço, foram adicionados 25 μ L de anticorpo de detecção. A placa foi selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação. Para a ligação aos anticorpos de detecção, foram adicionados 25 μ L de estreptavidina-PE nos poços. A placa foi novamente selada e incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com agitação. A etapa de lavagem foi repetida e foram adicionados 120 μ L de solução tampão sheath fluid em todos os poços. Por fim, foi feita a ressuspensão das beads por 5 minutos em agitador de microplacas.