

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ANA PAULA LUCAS MOTA**

**PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS COM FUNÇÃO RENAL ESTÁVEL:  
ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS/ HEMOSTÁTICOS E  
RELAÇÃO COM A FUNÇÃO RENAL E O TEMPO PÓS-TRANSPLANTE**

**Belo Horizonte – MG**

**2012**

**ANA PAULA LUCAS MOTA**

**PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI COM FUNÇÃO RENAL ESTÁVEL:  
ESTUDO DE BIOMARCADORES INFLAMATÓRIOS/HEMOSTÁTICOS E  
RELAÇÃO COM A FUNÇÃO RENAL E O TEMPO PÓS-TRANSPLANTE**

Tese submetida ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito final para obtenção do grau Doutor(a) em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Luci Maria Sant'Ana Dusse.

Co-orientadora: Profa. Dra. Karina Braga Gomes Borges.

Co-orientador: Dr. Olindo Assis Martins Filho

**Belo Horizonte – MG**

**2012**

*Dedico este trabalho ao tio José Celso, grande iniciador e incentivador da minha trajetória profissional. Sua partida precoce jamais será confortada. A saudade constante é uma maneira de dizermos o quanto era bom tê-lo aqui conosco. Agradeço pelo exemplo de trabalho e pela herança de amor que nos deixou.*

## **AGRADECIMENTOS**

Em especial, à minha orientadora, professora Doutora Luci Maria Sant'Ana Dusse, pela confiança, dedicação e amizade ao longo desses anos. Obrigada pelo trabalho contínuo, pelas palavras de incentivo, pela generosidade e compreensão.

À minha co-orientadora, professora Doutora Karina Braga Gomes Borges, por sua colaboração, carinho, amizade e paciência. Agradeço pelas inúmeras sugestões valiosas, desde a elaboração do pré-projeto até a execução final desta tese.

Ao pesquisador e co-orientador, Doutor Olindo Assis Martins Filho, pelo auxílio na interpretação das citocinas, pela disponibilidade e convívio.

À professora Doutora Maria das Graças Carvalho, pelo incentivo, carinho e amizade. Agradeço pelo convívio e por sua iluminada influência em minha carreira.

À professora Doutora Ana Cristina Simões e Silva, por disponibilizar o laboratório para separação e armazenamento das amostras.

Ao médico nefrologista Fernando Lucas, do Hospital Bias Fortes e à médica nefrologista Sandra Simone Vilaça, do Hospital Felício Rocho por incentivarem este trabalho e abrirem as portas dos ambulatórios de transplantes.

À colhedora Cláudia, do laboratório Imunolab, ao farmacêutico André e aos colhedores do laboratório Hermes Pardini, unidade Felício Rocho, pelo valioso auxílio na coleta das amostras de sangue.

Às funcionárias dos ambulatórios de transplantes do Hospital Bias Fortes e do Hospital Felício Rocho por disponibilizarem os prontuários dos pacientes e por me receberem tão bem.

À Andreia Teixeira de Carvalho e Amanda Cardoso Oliveira pelo auxílio na realização dos ensaios de citometria de fluxo no Instituto de Pesquisas René Rachou.

À Roberta Carvalho de Figueiredo pelo valioso auxílio nas análises estatísticas, por sua disponibilidade, paciência e interesse em ajudar. Muito obrigada!

Aos pacientes transplantados renais que contribuíram voluntariamente com este estudo.

Aos colegas do laboratório de Hematologia da Faculdade de Farmácia da UFMG, pelo convívio. Em especial à Melina de Barros Pinheiro, pelo auxílio na realização das técnicas de citometria de fluxo e por sua grande disponibilidade em ajudar. Aos professores, colegas e funcionários do programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG pelo apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas de trabalho da Unifenas, professores, secretárias, técnicos de laboratório, bibliotecárias e outros pelo incentivo, amizade e boas horas de convivência durante esses quatro anos e também antes deles. Às coordenadoras dos cursos, Danielle D'Ávila, Aneilde Brito, Lorena Fialho e Maria Elizabeth Totti, pelo incentivo e apoio em todos os momentos que precisei. Aos colegas de trabalho da Fumec, pelo convívio e apoio.

Às amigas Josiane Barbosa Piedade, Natália Castro de Carvalho Schachnik Nogueira, Rubimara Cristina Pinheiro e Sybele Márcia Starling pelo incentivo, amizade e bons conselhos.

À minha mãe, por sua preocupação diária, pelo amor e dedicação permanente aos filhos, por me ensinar o valor das pessoas, da família e do trabalho.

Ao meu pai, por seu afeto, alegria e incentivo constante. Pela admiração que demonstra por todos nós.

Aos meus irmãos, Raquel, Lilian, Marcus e Márlon, meus grandes e valiosos amigos, pelo apoio, pelas longas conversas, pela alegria e convívio, um pouco breve nos últimos tempos. É uma grande honra tê-los como irmãos e poder sentir o amor de vocês e por vocês todos os dias.

Em especial, ao meu irmão Marcus, por dividir todas as etapas do meu dia-a-dia, pela convivência, incentivo e pela ajuda valiosa na elaboração das figuras e formatação desse trabalho.

Em especial, ao Marcelo Maia, meu amigo e meu amor. Obrigada por sua companhia, apoio, compreensão, alegria e dedicação. Você é um grande presente! Admiro profundamente sua inteligência e serenidade. Obrigada pelo auxílio na elaboração dos gráficos e por sua presença em meu dia-a-dia.

À tia Veronice, minha amiga e colaboradora direta para minha formação, desde o início, há quase 17 anos atrás, quando me mudei para Belo Horizonte. Obrigada por seu carinho e preocupação!

Aos meus avós, tios, primos, cunhados e demais familiares por serem parte tão importante em minha vida. Ao meu sobrinho Vitor, alegria da família, pelo seu carinho, por ser uma criança tão especial, comunicativa e amorosa.

Em especial, ao meu avô Francisco, que partiu recentemente, deixando muita saudade, mas que também nos deixou como exemplo o trabalho, a valorização da família e o gosto pela vida.

À Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.

Agradeço sempre a Deus, minha fortaleza.

*“Dar o exemplo não é a melhor maneira  
de influenciar os outros, é a única”.*

*Albert Schweitzer*

## RESUMO

O transplante renal é a melhor opção de tratamento para a doença renal crônica em estágio dialítico. Este procedimento está associado à melhoria da qualidade de vida e maior sobrevivência dos pacientes com doença renal crônica terminal em comparação à diálise. O transplante renal é capaz de desencadear uma resposta inflamatória intensa e alterações no sistema hemostático. Entretanto os mecanismos fisiopatológicos que levam a essas alterações ainda não estão totalmente esclarecidos. O objetivo deste trabalho foi investigar biomarcadores inflamatórios e hemostáticos em pacientes submetidos ao transplante de rim, sem sinais clínicos de rejeição, em relação à função renal e ao tempo pós-transplante. Foram avaliados os níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ ) e reguladoras (IL-4, IL-5 e IL-10) por citometria de fluxo, e parâmetros hemostáticos (trombomodulina/TM, fator von Willebrand/FvW, ADAMTS13 e dímero D/D-Di) por imunoenensaio enzimático. Os pacientes foram distribuídos em subgrupos de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina (C1:<1,4mg/dL; C2:1,4-2,0mg/dL e C3:>2,0mg/dL) e o tempo pós-transplante (T1:1-24 meses; T2:25-60 meses; T3:61-120 meses e T4: >120 meses). Os resultados revelaram um aumento de D-Di e uma tendência à elevação de IL-6 no subgrupo C3 em relação ao C1. Níveis maiores de IL-5 foram obtidos no subgrupo T1 em relação ao T2 e níveis elevados de IL-12 foram obtidos no T4 em relação ao T3. A análise de regressão multinomial multivariada revelou que a ADAMTS13 foi associada aos níveis plasmáticos de creatinina. A análise de regressão logística multivariada mostrou que o sexo feminino, o subgrupo T3 e o D-Di foram associados ao ritmo de filtração glomerular. Estes resultados permitem concluir que o D-Di foi o marcador mais promissor para estimar a função renal. A regulação da inflamação a curto prazo foi mediada pela IL-5 enquanto a resposta pró-inflamatória a longo prazo foi mediada pela IL-12; a ADAMTS13 mostrou-se promissora para estimar a função renal; o sexo feminino e o tempo pós-transplante “61 a 120 meses” foram associados ao comprometimento do ritmo de filtração glomerular.

Palavras-chave: Transplante renal. Citocinas. Hemostasia.

## ABSTRACT

Kidney transplantation is a best treatment option for chronic renal disease in dialysis stage. This process is associated with improved quality of life and longer survival of patients with end stage renal disease compared to dialysis. Renal transplant is able to trigger an intense inflammatory response and alterations in the hemostatic system. However the pathophysiological mechanisms leading to these changes are not completely understood. The aim of this study was to investigate inflammatory and hemostatic biomarkers in patients undergoing renal transplant according to renal function and post-transplant time without clinical signs of rejection. We evaluated the plasma levels of regulatory (IL-4, IL-5 e IL-10) and proinflammatory cytokines (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ ) by flow cytometry and hemostatic parameters (thrombomodulin/TM, von Willebrand factor/FvW, ADAMTS13 and D dimer/D-Di) by ELISA. The patients were classified into subgroups according to creatinine plasma levels (C1:<1.4mg/dL; C2:1.4-2.0mg/dL e C3:>2.0mg/dL) and time post transplant (T1:1-24 months; T2:25-60 months; T3:61-120 months e T4: >120 months). Results showed an increase of D-Di and tendency to increase of IL-6 levels in the subgroup C3 compared to C1. Higher levels of IL-5 were obtained in the subgroup T1 compared to T2 as well as high levels of IL-12 were obtained in T4 when compared to T3. Multinomial regression analysis revealed that ADAMTS13 was associated with creatinine plasma levels. A multivariate logistic regression analysis showed that the female, subgroup T3 and Di-D levels were associated with glomerular filtration rate. These results suggest that the D-Di was a promising marker to estimate renal function. Moreover, the regulation of inflammation in the short term was mediated by IL-5 and the pro-inflammatory state in the long was mediated by IL-12. Besides, ADAMTS13 has shown promise for estimating renal function; and female gender and post-transplant time "61-120 months" were associated with impairment of glomerular filtration rate.

Key-words: Renal Transplant. Cytokine. Haemostasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>Anatomia do sistema excretor humano.....</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Estruturas internas do rim humano aberto .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>Organização simplificada do néfron humano .....</b>	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>Esquema integrado da patogênese do desenvolvimento da disfunção crônica do enxerto (rejeição crônica).....</b>	<b>39</b>
<b>5</b>	<b>Iniciação da coagulação.....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Amplificação da coagulação.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>Propagação da coagulação.....</b>	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Níveis plasmáticos (MFI) de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras nos subgrupos de pacientes transplantados renais, em função das concentrações de creatinina .....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>Perfil de citocinas (MFI) em pacientes transplantados renais em função dos níveis plasmáticos de creatinina .....</b>	<b>79</b>
<b>10</b>	<b>Categorização dos pacientes transplantados renais como “baixos” ou “altos” produtores de citocinas pró-inflamatórias ou reguladoras, de acordo com a mediana global obtida para cada citocina.....</b>	<b>80</b>
<b>11</b>	<b>Frequência (%) de pacientes baixos e altos produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras.....</b>	<b>82</b>
<b>12</b>	<b>Perfil ascendente de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função dos níveis plasmáticos de creatinina.....</b>	<b>83</b>
<b>13</b>	<b>Assinaturas de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função dos níveis plasmáticos de creatinina .....</b>	<b>84</b>
<b>14</b>	<b>Níveis plasmáticos de parâmetros hemostáticos nos subgrupos (C1, C2 e C3) de pacientes transplantados renais, em função das concentrações de creatinina.....</b>	<b>85</b>
<b>15</b>	<b>Níveis plasmáticos das citocinas (MFI) por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função do tempo pós-transplante .....</b>	<b>86</b>
<b>16</b>	<b>Perfil de citocinas (MFI) em pacientes transplantados renais. Dados apresentados como média móvel dos níveis plasmáticos de IL-8, IL-6, IL-1<math>\beta</math>, TNF-<math>\alpha</math>, IL-12, IFN-<math>\gamma</math>, IL-4, IL-5 e IL-10 em função do tempo pós-transplante .....</b>	<b>87</b>
<b>17</b>	<b>Frequência (%) de pacientes baixos e altos produtores de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, em função do tempo pós-transplante .....</b>	<b>89</b>
<b>18</b>	<b>Perfil ascendente de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais .....</b>	<b>90</b>
<b>19</b>	<b>Assinaturas de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais.....</b>	<b>91</b>
<b>20</b>	<b>Níveis plasmáticos de parâmetros hemostáticos nos subgrupos (T1, T2, T3 e T4) de pacientes transplantados renais, em função do tempo pós-transplante.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>1</b>	<b>Características clínicas dos integrantes do estudo .....</b>	<b>75</b>
<b>2</b>	<b>Análise de regressão multinomial univariada em função dos níveis plasmáticos de creatinina. ....</b>	<b>94</b>
<b>3</b>	<b>Coeficiente de associação, intervalo de confiança (IC) e valor de p do modelo da regressão multinomial multivariada, considerando como variável resposta os níveis plasmáticos de creatinina .....</b>	<b>95</b>
<b>4</b>	<b>Análise de regressão logística univariada em função do ritmo de filtração glomerular (eRFG) .....</b>	<b>96</b>
<b>5</b>	<b><i>Odds ratio</i>, intervalo de confiança (IC) e valor de p do modelo de regressão logística multivariada, considerando como variável resposta o eRFG .....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTO	associação brasileira de transplante de órgãos
ADAMTS13	<i>a desintegrin and metalloprotease with eight thrombospondin-1-like-member 13</i>
ADP	adenosina difosfato
AT	antitrombina
CBA	<i>cytometric beads array</i>
CDC	citotoxicidade dependente de complemento
CMV	citomegalovírus
CSA	ciclosporina A
D-Di	dímero D
DM	diabetes mellitus
DRC	doença renal crônica
DRCT	doença renal crônica terminal
EPCR	receptor endotelial para proteína C da coagulação
FIAT	fibrose intersticial/atrofia tubular
FVa	fator V ativado
FvW	fator von Willebrand
FXa	fator X ativado
FXIIIa	fator XIII ativado
gmFvW	grandes multímeros do fator von Willebrand
HAS	hipertensão arterial sistêmica
HD	hemodiálise
HLA	antígenos leucocitários humanos
IFN- $\gamma$	interferon gama
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IL-1	interleucina 1
IL-1 $\beta$	interleucina 1 cadeia beta
IL-10	interleucina 10
IL-13	interleucina 13
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-4R	receptor para interleucina 4

IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-12	interleucina 12
IL-12p70	interleucina 12 com cadeia de 70kDa, biologicamente ativa
IL-15	interleucina 15
IMC	índice de massa corporal
ITU	infecção do trato urinário
kDa	quilodáltons
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos do tipo 1
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i>
MHC	complexo principal de histocompatibilidade
MMF	micofenolato mofetil
MPA	ácido micofenólico
NK	<i>natural killer</i>
NO	óxido nítrico
PAI-1	inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1
PC	proteína C
PCa	proteína C ativada
PCR	proteína C reativa
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PGI2	prostaglandina I2
PRA	reatividade contra painel de linfócitos
RAPA	rapamicina
eRFG	ritmo de filtração glomerular estimado
SBN	sociedade brasileira de nefrologia
SHU	síndrome hemolítica urêmica
SNT	sistema nacional de transplantes
SUS	sistema único de saúde
Tacr	tacrolimus
TAT	complexo trombina-antitrombina
TCR	receptor de célula T
TEV	tromboembolismo venoso
TFG	taxa de filtração glomerular

TFPI	inibidor da via do fator tissular
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformador do tipo beta
TM	trombomodulina
TNF-	fator de necrose tumoral
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral do tipo alfa
TOR	proteína-alvo da rapamicina
t-PA	ativador tecidual de plasminogênio
TRS	terapia renal substitutiva
u-PA	ativador de plasminogênio tipo uroquinase
VCAM-1	molécula de adesão à célula vascular do tipo 1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>20</b>
2.1 Fisiologia renal .....	21
2.2 Doença renal crônica .....	25
2.3 Transplante renal .....	28
2.3.1 <u>Histórico</u> .....	28
2.3.2 <u>Imunologia do transplante renal</u> .....	32
2.4 Hemostasia .....	46
2.4.1 <u>Endotélio vascular</u> .....	46
2.4.2 <u>Coagulação Sanguínea</u> .....	50
2.4.3 <u>Sistema fibrinolítico</u> .....	54
2.4.4 <u>Alterações hemostáticas e o processo de rejeição</u> .....	56
2.5 Terapia imunossupressora.....	57
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>62</b>
3.1 Objetivo geral .....	63
3.2 Objetivos específicos.....	63
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>64</b>
4.1 Delineamento experimental .....	65
4.2 Casuística .....	66
4.2.1 <u>Crítérios de inclusão</u> .....	67
4.2.2 <u>Crítérios de exclusão</u> .....	67
4.3 Amostras biológicas .....	69
4.3.1 <u>Preparo e conservação das amostras biológicas</u> .....	69
4.4 Preparo do banco de dados .....	69
4.5 Métodos.....	70
4.5.1 <u>Determinação plasmática de citocinas por citometria de fluxo (CBA – Cytometric Beads Array)</u> .....	70
4.5.2 <u>Determinação plasmática de Trombomodulina (TM)</u> .....	71
4.5.3 <u>Determinação plasmática de Fator de von Willebrand (FvW)</u> .....	71
4.5.4 <u>Determinação plasmática de ADAMTS13</u> .....	72
4.5.5 <u>Determinação plasmática de dímero-D (D-Di)</u> .....	72
4.5.6 <u>Análise dos prontuários e elaboração do banco de dados</u> .....	73

4.5.7 <u>Análise dos dados</u> .....	73
5 RESULTADOS.....	74
5.1 Características clínicas da população estudada.....	75
5.2 Distribuição dos pacientes transplantados renais em subgrupos .....	77
5.3 Avaliação das citocinas em função dos níveis plasmáticos de creatinina ..	77
5.5 Avaliação dos parâmetros hemostáticos em função dos níveis plasmáticos de creatinina .....	85
5.6 Avaliação de citocinas em função do tempo pós-transplante .....	86
5.7 Avaliação de parâmetros hemostáticos em função do tempo pós-transplante .....	92
5.8 Associação dos parâmetros inflamatórios, hemostáticos e clínicos com a função renal.....	93
5.8.1 <u>Associação dos parâmetros avaliados com os níveis plasmáticos de creatinina</u> .....	93
5.8.2 <u>Associação dos parâmetros avaliados com o eRFG</u> .....	95
6 DISCUSSÃO .....	97
6.1 Características clínicas dos pacientes transplantados renais.....	98
6.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nos pacientes transplantados renais de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina .....	103
6.3 Avaliação dos parâmetros hemostáticos nos pacientes transplantados renais de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina .....	106
6.4 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nos pacientes transplantados renais em função do tempo pós-transplante .....	109
6.5 Avaliação dos parâmetros hemostáticos nos pacientes transplantados renais em função do tempo pós-transplante .....	112
6.6 Análise uni e multivariada dos parâmetros inflamatórios, hemostáticos e clínicos em função dos níveis plasmáticos de creatinina e do eRFG .....	113
7 CONCLUSÕES .....	115
8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO .....	117
9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO.....	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXOS .....	136
PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS .....	144
ARTIGOS.....	152

# *1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA*

## 1 INTRODUÇÃO E RELEVÂNCIA

Os primeiros transplantes de rins foram realizados no início do século XX, após o desenvolvimento das técnicas vasculares nas cirurgias. O transplante de rim foi o pioneiro, dentre os transplantes de órgãos em geral, por se tratar de órgãos pares, com vascularização relativamente simples e diagnóstico das alterações patológicas definido sem maiores complicações, por meio de exames de sangue e urina.

O transplante renal é o tratamento de escolha para um número significativo de pacientes com doença renal crônica. Este procedimento está associado à melhoria da qualidade de vida e maior sobrevida dos pacientes com nefropatias, em comparação à diálise, tanto do ponto de vista clínico, quanto social ou econômico. No entanto, a rejeição ao rim transplantado permanece como a principal causa de disfunção e perda do enxerto no pós-transplante recente e tardio. A rejeição ao rim envolve uma série de interações celulares, mediadas por células T, e interações humorais, mediadas por anticorpos.

Atualmente, observa-se uma redução da incidência de rejeição ao rim transplantado, em particular a rejeição aguda, que diminuiu para cerca de 10% nos últimos 10 anos, contribuindo para maior sobrevida do órgão e do paciente. Isto se deve ao avanço da indústria farmacêutica relativo aos imunossuppressores, a terapia pós-transplante, bem como o aprimoramento das técnicas cirúrgicas. Entretanto, a disfunção crônica do enxerto e a perda do rim transplantado a longo prazo permanecem como o principal problema pós-transplante.

A realização do transplante com doadores vivos tem proporcionado melhores resultados pós-transplante a curto e longo prazo. Acredita-se que a similaridade do HLA (antígenos leucocitários humanos) entre o doador e o receptor seja uma condição essencial para o sucesso do transplante, principalmente considerando a sobrevida do enxerto ao longo de cinco a dez anos. No entanto, sabe-se que a retirada de um rim de um indivíduo hígido pode acarretar prejuízo ao mesmo.

O número total de pacientes em diálise no Brasil vem aumentando gradativamente ao longo dos anos. No ano 2000 havia 42.695 pacientes em tratamento dialítico e em 2011, este número aumentou para 91.314. Deste total, cerca de 90% dos pacientes faziam tratamento por hemodiálise. O número estimado de pacientes em espera na fila para o transplante renal, no primeiro semestre de

2012, era de 21.686, o que corresponde a 24% do total de pacientes em diálise. Esta taxa é inferior à esperada, que seria de 30 a 40%, e o motivo principal é o atraso na avaliação clínica e cadastro dos pacientes com doença renal crônica terminal.

No Brasil, a taxa de mortalidade entre os pacientes com nefropatias crônicas permanece elevada, em torno de 18% ao ano. Por outro lado, segundo dados do Ministério da Saúde e da Associação Brasileira de Transplante de Órgãos (ABTO), foram realizados 2.689 transplantes renais no primeiro semestre de 2012. Este número representa 72,6% do total de transplantes de órgãos sólidos realizados no país.

A análise das taxas de doação, no primeiro semestre de 2012, comparadas ao mesmo período do ano anterior, mostra um aumento de 16,4% de doadores efetivos e de 13,1% de doadores, cujos rins foram retirados para doação. Apesar deste aumento, o número de órgãos disponíveis para o transplante renal é menor que o número de pacientes com doença renal crônica terminal na fila dos transplantes.

O transplante renal é um procedimento capaz de desencadear uma reação inflamatória intensa e, conseqüentemente, induzir a produção plasmática de citocinas, que estão diretamente envolvidas na resposta imunológica e nos mecanismos que desencadeiam a rejeição ao rim transplantado. A resposta imunológica tem sido alvo de inúmeras pesquisas visando a melhoria dos resultados pós-transplante.

Sabe-se que o paciente com doença renal crônica sob hemodiálise, apresenta alterações do sistema hemostático, resultantes principalmente do contato do sangue com a superfície artificial da fístula utilizada para a diálise e com o circuito extracorpóreo. O fluxo turbulento nesse circuito resulta na ativação de plaquetas e de monócitos que, por sua vez, expressam fator tissular, contribuindo para o desencadeamento da coagulação sanguínea. Além disso, os pacientes em diálise podem apresentar alterações ácido-básicas ou eletrolíticas que podem determinar o estabelecimento de um ambiente pró-trombótico. Dessa forma, a avaliação de marcadores capazes de prever as alterações da hemostasia, que poderiam resultar na formação de trombos na microcirculação do órgão transplantado e comprometer a sobrevida do mesmo, é altamente desejável.

Admitindo-se que as citocinas e quimiocinas são capazes de ativar os componentes do sistema hemostático e esses, por sua vez, ativam a resposta inflamatória, o esclarecimento da inter-relação entre a inflamação e hemostasia certamente irá contribuir para a monitoração pós-transplante dos pacientes, bem como para a prevenção da rejeição ao órgão transplantado.

A principal motivação para a realização do presente estudo foi estabelecer a associação de biomarcadores inflamatórios e hemostáticos com a função renal, o tempo pós-transplante e as características clínicas dos pacientes.

Cumprindo ressaltar que este é o primeiro estudo realizado no Brasil associando o perfil de seis citocinas pró-inflamatórias e três reguladoras a marcadores de lesão vascular e de formação/degradação da fibrina, em pacientes com concentrações distintas de creatinina plasmática e tempos pós-transplante.

Considerando a heterogeneidade dos pacientes transplantados renais e o caráter multifatorial do processo de rejeição ao enxerto, bem como as lacunas na literatura com relação à etiologia desse processo e a dificuldade de estabelecer seu diagnóstico e tratamento, este estudo se justifica plenamente e poderá resultar na definição de marcadores para a monitoração e prognóstico pós-transplante, possibilitando a contribuição mais efetiva do laboratório à clínica.

## *2 REFERENCIAL TEÓRICO*

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Fisiologia renal

O sistema excretor humano é composto pelos rins, ureteres, bexiga e uretra (Figura 1). Os rins são órgãos pares, excretores e reguladores, localizados na região lombar retroperitoneal, um de cada lado da coluna vertebral, na altura dos arcos costais mais inferiores, aproximadamente entre a 10<sup>a</sup> e 12<sup>a</sup> costelas. Os rins executam diversas funções essenciais, como o controle da osmolaridade plasmática, o balanço hidro-eletrolítico, o equilíbrio ácido-base, a excreção de produtos do metabolismo e a produção de hormônios (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006).

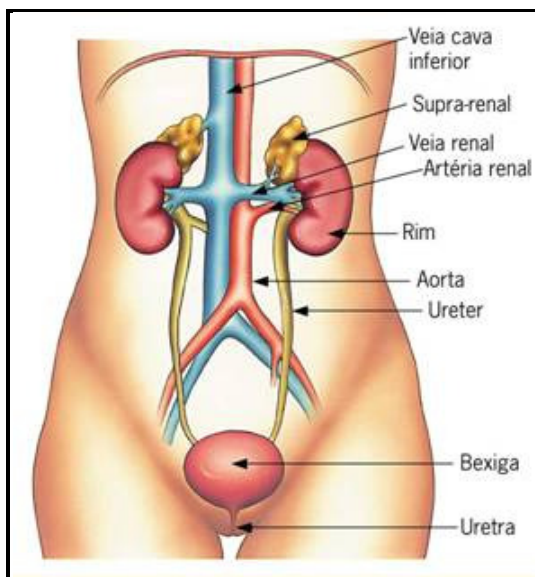
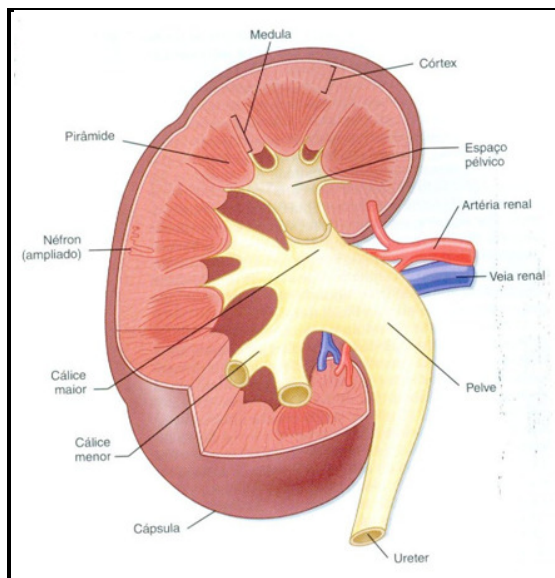


Figura 1 - Anatomia do sistema excretor humano.

Fonte: SBN, 2011.

No adulto humano cada rim pesa entre 115 a 170g, tendo aproximadamente 11cm de comprimento, 6cm de largura e 3cm de espessura. A parte mediana de cada rim apresenta uma reentrância, onde se localizam as artérias, veias, nervos e a pelve renal. Internamente os rins apresentam duas regiões, uma externa, o córtex e uma interna, a medula renal. O córtex e a medula renais são compostos por néfrons, vasos sanguíneos, linfáticos e nervos (Figura 2) (KOEPPEN; STANTON, 2009).

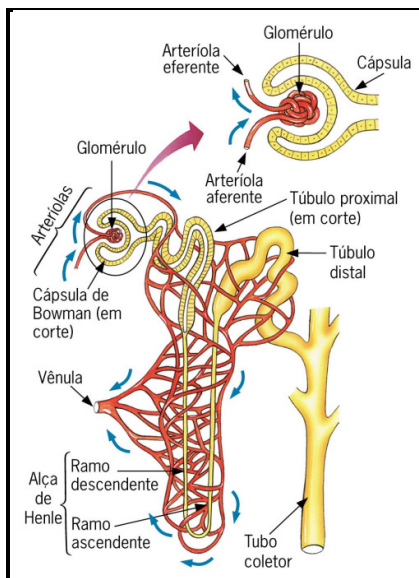


**Figura 2 - Estruturas internas do rim humano aberto.**

**Fonte: KOEPPEN; STANTON, 2009.**

As diversas funções renais são realizadas de forma integrada pelos milhões de néfrons, unidades funcionais dos rins. Cada néfron é constituído por uma unidade de filtração, o corpúsculo renal, formado pelos capilares glomerulares e pela cápsula de Bowman, e por uma estrutura tubular que apresenta segmentos sucessivos dispostos em um arranjo em série, sendo esses o túbulo proximal, a alça de Henle, o túbulo distal e o ducto coletor (Figura 3). Na realidade, a organização do néfron é bem mais complexa, mas para fins didáticos, sua estrutura pode ser dividida dessa forma (BARROS et al., 2006).

Cada rim humano adulto é constituído por aproximadamente 1.500.000 néfrons que recebem cerca de 25% do débito cardíaco. O sangue é filtrado a uma velocidade de 100 a 120mL/minuto e apenas 1% desse volume é eliminado pela urina. Para que os rins sejam eficientes na formação da urina, é necessária a amplificação integrada das funções dos néfrons, que diferem entre si quanto à morfologia e função ao longo do eixo corticomedular renal. Essa heterogeneidade morfológica e funcional dos néfrons é fundamental para os mecanismos que envolvem as funções renais (BARROS et al., 2006).



**Figura 3 - Organização simplificada do néfron humano.**

**Fonte: CÉSAR; SEZAR; CALDINI, 2011.**

Os néfrons são classificados em superficial e justamedular. O corpúsculo renal de cada néfron superficial localiza-se na região externa do córtex renal e sua alça de Henle é curta, o corpúsculo renal de cada néfron justamedular localiza-se na região do córtex, adjacente à medula, sua alça de Henle é mais longa e se estende mais profundamente pela região medular renal (KOEPPEN; STANTON, 2009).

A filtração glomerular pode ser considerada uma das mais importantes funções renais e ocorre através de uma membrana semipermeável, em consequência do aumento da pressão hidrostática nos glomérulos renais. Os glomérulos são constituídos por uma rede de capilares que recebem sangue da arteríola aferente e drenam na arteríola eferente. Os capilares são cobertos por células epiteliais chamadas podócitos, que formam a camada visceral da cápsula de Bowman. As células da camada visceral são modificadas e voltadas para fora no pólo vascular, onde as arteríolas aferentes e eferentes entram e saem da cápsula de Bowman, para formarem a camada parietal da cápsula. O espaço entre a camada visceral e a camada parietal é chamado espaço de Bowman, o qual dá origem ao lúmen do túbulo proximal (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006).

As células endoteliais dos capilares glomerulares são cobertas por uma membrana basal, a qual está envolvida pelos podócitos. O endotélio capilar, a membrana basal e os podócitos formam a “barreira de filtração glomerular”. O endotélio capilar é fenestrado e livremente permeável à água e pequenos solutos,

como sódio, ureia e glicose. A membrana basal glomerular separa os podócitos do endotélio e funciona como uma barreira importante para a filtração de proteínas plasmáticas. A formação da urina começa com o movimento passivo do ultrafiltrado plasmático dos capilares glomerulares para o espaço de Bowman e a partir daí para o túbulo proximal (LEVY; KOEPPEN; STANTON, 2006).

O túbulo proximal forma inicialmente diversas convoluções, seguidas por um trecho reto que desce em direção à medula renal. O próximo segmento é a alça de Henle, composta pela parte reta final do túbulo proximal, pelo ramo descendente fino, pelo ramo ascendente fino (somente em néfrons justamedulares) e pelo ramo ascendente espesso. Ao final do ramo ascendente espesso, um segmento curto, chamado mácula densa, entra em contato com as arteríolas aferentes e eferentes que irrigam os néfrons. O túbulo distal inicia-se logo após a mácula densa e se estende até o ponto onde dois ou mais néfrons se unem para formar o sistema de ducto coletor (KOEPPEN; STANTON, 2009).

Após o fenômeno da filtração glomerular, ocorrem outros dois eventos ao longo do sistema de túbulos renais: a reabsorção e a secreção tubulares e esses ocorrem em direções opostas (AIRES et al., 2008).

O filtrado glomerular que alcança os túbulos dos néfrons flui através do túbulo proximal, alça de Henle, túbulo distal e ducto coletor até atingir a pelve renal. Ao longo deste percurso, 99% da água plasmática filtrada é reabsorvida. A glicose e os aminoácidos são quase inteiramente reabsorvidos com a água. A reabsorção tubular obedece à diferença de concentração das substâncias entre o espaço intersticial peritubular e os vasos retos peritubulares (ROSE & RENNKE, 1999).

A secreção tubular ocorre em direção oposta à reabsorção. As substâncias são transportadas do interior dos capilares para a luz dos túbulos, de onde são eliminadas juntamente com a urina. Os processos de secreção mais importantes estão relacionados à secreção tubular dos íons hidrogênio e potássio e da amônia (ROSE & RENNKE, 1999).

As doenças renais capazes de alterar a taxa de filtração glomerular são as mais comuns. Os glomérulos podem ser comprometidos por doenças sistêmicas ou doenças limitadas ao rim. Os achados clínicos e bioquímicos resultam de distúrbios fundamentais que levam a alterações na permeabilidade e na seletividade dos capilares, com passagem anormal de proteínas e outros elementos para a urina. Por outro lado, alterações na superfície de filtração glomerular, com eventual redução da

excreção de ureia e creatinina, ou distúrbios hidroeletrólíticos e ácido-base também podem ocorrer. Apesar deste conhecimento, a fisiopatologia das doenças renais é bastante complexa e ainda há muito a ser esclarecido.

## **2.2 Doença renal crônica**

A doença renal crônica (DRC) constitui um problema de saúde pública importante no Brasil e em todo mundo e está associada à elevada morbidade e mortalidade e sua incidência e prevalência. Os custos para manter os pacientes em terapia renal substitutiva (TRS), têm aumentado progressivamente a cada ano (SESSO; GORDAN, 2007).

Inúmeras doenças renais primárias ou sistêmicas podem, por meio de mecanismos distintos de agressão ao rim, resultar em DRC. A taxa de mortalidade anual é bastante elevada em pacientes com DRC, principalmente entre aqueles que estão em terapia dialítica e decorre, principalmente, de eventos cardiovasculares. A população dialítica possui diversos fatores de risco para estes eventos, tais como uremia crônica, distúrbios hidroeletrólíticos e oscilação ácido-base, o que torna a DRC, bem como os pacientes em diálise, uma população peculiar para estudos investigativos, principalmente no que diz respeito à mortalidade cardiovascular (AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2010).

A DRC é definida pela presença de lesão renal ou pela redução significativa e progressiva da taxa de filtração glomerular (TFG) por três ou mais meses. Estima-se que a TFG decline, fisiologicamente, cerca de 1% a cada ano após a terceira década de vida, portanto, a idade constitui um fator de risco independente para o desenvolvimento da DRC. Além da idade, o diabetes mellitus, a obesidade, a hipertensão arterial e as doenças vasculares são considerados fatores de risco importantes para a DRC (GRAVES, 2008).

A DRC ocorre quando há lesões irreversíveis ao rim, com anormalidades estruturais ou funcionais, com duração igual ou maior a três meses, confirmada por biópsia ou pela determinação de marcadores de lesão renal (hematúria glomerular, proteinúria ou alteração em exame de imagem) ou pela redução da taxa de filtração glomerular ( $TFG < 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ) com duração igual ou maior a 3 meses, com ou sem presença de lesão renal (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002;

AMERICAN HEART ASSOCIATION, 2003; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, 2010).

Desde 2002, a DRC é classificada em estágios (1 a 5), de acordo com a gravidade do problema. No primeiro estágio estão incluídos os pacientes que apresentam fatores de risco para a doença renal, mas que ainda preservam a função de depuração normal, ou seja, o ritmo de filtração glomerular é maior ou igual a  $90\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$  (BARROS et al., 2006).

Posteriormente, a disfunção renal é indicada por uma TFG decrescente ou a lesão renal é caracterizada pelo aumento da excreção urinária de albumina. Desta forma, a DRC é classificada em cinco estágios, conforme a seguir:

- Estágio 1: a filtração glomerular é normal ( $\geq 90\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ), mas há evidências de lesão renal (proteinúria positiva, por exemplo);
- Estágio 2: existe lesão renal e diminuição leve da função de filtração glomerular (TFG entre 60 e  $89\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ );
- Estágio 3: a filtração glomerular está entre 30 e  $59\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , com perda moderada da função renal;
- Estágio 4: perda grave da função renal, com filtração glomerular entre 15 e  $29\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ;
- Estágio 5:  $\text{TFG} < 15\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ , independente da presença ou ausência de lesão renal. Este estágio é conhecido como insuficiência renal terminal ou doença renal crônica terminal (DRCT) e necessita de tratamento por diálise ou transplante renal (NATIONAL KIDNEY FOUNDATION, 2002; BARROS et al., 2006; FINK et al., 2012).

A DRC é geralmente assintomática até seus estágios mais avançados e sua progressão é bastante variável e individualizada. Apesar disto, a existência da DRC, mesmo em seus estágios iniciais, aumenta o risco para outras doenças, principalmente as cardiovasculares, e para a mortalidade precoce dos pacientes. Em todo o mundo, à medida que ocorre declínio da TFG, há também um incremento na taxa de mortalidade e de eventos cardiovasculares em pacientes com DRC (HASSANIEN et al., 2012; FINK et al., 2012).

O pior prognóstico para complicações cardiovasculares ocorre na população com DRC em estágio 5, em decorrência da necessidade de terapia dialítica e pela elevada morbidade e mortalidade. Estes pacientes são candidatos ao transplante

renal e permanecem em diálise crônica, principalmente pelo método da hemodiálise, à espera de um doador compatível (SESSO et al., 2008; SESSO et al., 2011).

De acordo com inquéritos realizados pela Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) em 2011, as principais doenças reportadas como causa da DRC no Brasil foram: hipertensão arterial (35,1%), diabetes mellitus (28,4%) e glomerulonefrite crônica (11,4%). Segundo dados da SBN, existiam 91.314 pacientes em tratamento dialítico no Brasil, no ano de 2011. Desses, 57,3% eram do sexo masculino; 66,9% possuíam idade entre 19 e 64 anos e 27,2% entre 65 e 80 anos; 9,3% não conheciam a etiologia de sua doença e 84,9% dos tratamentos dialíticos eram financiados pelo SUS (SBN, 2011).

Frequentemente tem sido demonstrada a ligação entre a inflamação crônica e o risco de desenvolver determinadas doenças, entre elas a doença aterosclerótica, o diabetes mellitus e a DRC. Especificamente na DRC, sinais de ativação permanente do sistema imune podem ser observados, mesmo em estágios precoces, e níveis elevados de mediadores inflamatórios têm sido determinados e associados a um pior prognóstico (BARROS et al., 2006).

A DRC, bem como o processo de hemodiálise, predispõem ao estado pró-aterogênico. O aumento da tendência à trombose resulta da ativação de plaquetas e dos fatores da coagulação. As plaquetas ativadas liberam fatores de crescimento, como o PDGF (*platelet-derived growth factor*), que facilita a agregação de novas plaquetas, ativadas e não ativadas. Além disso, a retenção de toxinas urêmicas, a hipertensão arterial, o diabetes mellitus e a dislipidemia, frequentemente associados à DRC, contribuem para a lesão endotelial e inflamação crônica nestes pacientes (MALYSZKO et al., 1996; MALYSZKO et al., 2006b).

Neste sentido, o transplante renal aparece como o tratamento de escolha para um número significativo de pacientes com doença renal crônica terminal. A realização do transplante de rim está associada à melhoria da qualidade de vida e a maior sobrevivência dos pacientes nefropatas, em comparação à diálise, tanto do ponto de vista clínico, quanto social ou econômico (GALLIFORD & GAME, 2009).

## **2.3 Transplante renal**

### **2.3.1 Histórico**

O transplante renal foi um dos primeiros procedimentos de transplante de órgãos sólidos realizados no início do século XX, utilizando técnicas cirúrgicas desenvolvidas por Alexis Carrel. Alguns fundamentos destas técnicas são empregados até os dias atuais. O médico e pesquisador Alexis Carrel foi agraciado com o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1912, em função dos esforços realizados referentes aos transplantes e foi a primeira vez que o Prêmio Nobel fora concedido a um cientista de um laboratório experimental (PEREIRA, 2004; SILVA, 2008).

O termo transplante foi utilizado pela primeira vez pelo pesquisador John Hunter em 1778, que descreveu seus experimentos com enxertos ovarianos e testiculares em animais experimentais. Em 1902, o pesquisador Ullmann, da Escola de Medicina de Viena, realizou o primeiro autotransplante de rim, implantando o órgão nos vasos sanguíneos do pescoço de um cão. Alguns anos depois, em 1906, foram realizados os primeiros xenotransplantes, com a implantação de um rim de porco e um outro de uma cabra, nos vasos sanguíneos do braço e da perna de um homem. No entanto, os dois rins transplantados funcionaram apenas por uma hora. Em 1933 foi realizado o primeiro alotransplante renal humano, por Voronoy, na Ucrânia. Este procedimento visava tratar uma insuficiência renal aguda causada por envenamento com mercúrio, mas o rim foi retirado do doador cerca de seis horas após a parada cardíaca e o receptor faleceu 48 horas após o procedimento. Posteriormente, no início da década de 50, vários transplantes renais em humanos foram realizados na França e nos Estados Unidos. No entanto, nenhuma droga imunossupressora era empregada neste período e estes transplantes não tiveram êxito (PEREIRA, 2004).

O primeiro transplante renal no Brasil foi realizado em 1965, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em um paciente que recebeu o órgão do irmão (doador vivo) e o primeiro transplante renal com doador falecido foi realizado em 1967, no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo. Nos anos seguintes, o

número de centros de transplantes renais no Brasil aumentou progressivamente e, em 1976, foram realizados cerca de 730 transplantes de rim (BRASIL, 2010).

O rim a ser transplantado pode ser obtido de um doador vivo ou falecido. Considera-se doador vivo aparentado, o parente consanguíneo na linha reta ou colateral, até o quarto grau. A vantagem do doador vivo é a melhor condição do rim, que reflete em maior sobrevida do enxerto. Do ponto de vista do receptor, o transplante de rim de um doador vivo é a melhor opção terapêutica. Entretanto, o doador vivo poderá apresentar problemas futuros em relação à função renal. A cirurgia realizada com doador falecido está associada à maior incidência de rejeição e menor sobrevida, tanto para o rim transplantado, quanto para o paciente. A expectativa atual é que o número de transplantes renais com doadores falecidos aumente, uma vez que a retirada de um rim saudável constitui um prejuízo para o doador vivo. Dessa forma, esforços vêm sendo feitos para compreender melhor e controlar o processo de rejeição pós-transplante (WEITZ et al., 2006; GALLIFORD & GAME, 2009).

O tempo de diálise realizada antes do transplante renal também está relacionado à sobrevida do enxerto no período pós-transplante. Estudos sugerem que quanto maior é o tempo em diálise, maiores são as chances de comorbidades associadas ao tratamento dialítico, comprometendo a função renal e a sobrevida do enxerto no pós-transplante. Neste sentido, a realização do transplante preemptivo, antes mesmo da necessidade de diálise, poderia melhorar a sobrevida do enxerto e diminuir o risco de rejeições (WEITZ et al., 2006; GALLIFORD & GAME, 2009; DAVIS, 2010; HELDAL et al., 2011).

Atualmente, o Brasil possui o maior programa público de transplantes do mundo. Durante o primeiro semestre de 2012 foram realizados 3.703 transplantes de órgãos sólidos, sendo 2.689 transplantes renais. Destes, 710 foram realizados com doadores vivos e 1.979 com doadores falecidos (Quadro1) (ABTO, 2012).

**Quadro 1 - Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil durante o 1º semestre de 2012**

Órgãos	Total	Doador Vivo	Doador Falecido
Coração	108	-	108
Fígado	801	55	746
Pâncreas	20	-	20
Pâncreas/Rim	55	-	55
Pulmão	30	1	29
Rim	2.689	710	1.979
Total	3.703	766	2.937

**Fonte: ABTO, 2012**

O Quadro 2 apresenta a evolução anual de transplantes de órgãos, em número absoluto, realizados no Brasil, entre 2000 e 2011 (ABTO, 2011).

**Quadro 2 - Número de transplantes de órgãos sólidos realizados no Brasil entre os anos de 2000 e 2011**

Órgãos	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Coração	121	131	150	174	203	181	148	159	200	201	166	160
Fígado	485	564	671	816	956	949	1037	1007	1176	1334	1413	1492
Pâncreas	46	119	192	217	255	177	187	165	174	160	133	181
Pulmão	25	23	34	42	46	45	49	46	53	59	60	49
Rim	2913	3115	3045	3184	3484	3359	3278	3460	3814	4288	4630	4957

**Fonte: ABTO, 2011**

A política nacional de transplantes de órgãos e tecidos no Brasil está fundamentada na Legislação (Lei nº 9.434/1997 e Lei nº 10.211/2001), tendo como diretrizes a gratuidade da doação, a beneficência em relação aos receptores e não maleficência em relação aos doadores vivos. Esta legislação estabelece também garantias e direitos aos pacientes que necessitam deste procedimento e regula toda a rede assistencial por meio de autorizações e habilitações de funcionamento de equipes e instituições. Toda a política de transplante está em sintonia com as Leis nº 8.080/1990 e nº 8.142/1990, que regem o funcionamento do Sistema Único de Saúde - SUS (BRASIL, 2010).

O Brasil possui 548 estabelecimentos de saúde e 1.376 equipes médicas autorizados a realizar o transplante pelo Sistema Nacional de Transplantes (SNT). O SNT é o órgão responsável pela administração dos procedimentos financiados pelo

SUS e está presente em 25 estados do país, por meio das Centrais Estaduais de Transplantes. No entanto, o SNT ainda é um órgão sem recursos adequados e sem pessoal técnico especializado. Os investimentos crescentes e a aplicação de recursos pelo sistema público na realização de cirurgias de transplantes têm proporcionado um crescimento contínuo desta atividade (BRASIL, 2010).

Em setembro de 2010, o governo federal, por meio do Ministério da Saúde, lançou uma campanha nacional de incentivo à doação de órgãos e tecidos, além de anunciar um pacote de melhorias para este setor no valor de 76 milhões de reais. Estas medidas, juntamente com a mobilização social e a capacitação de profissionais, deverão resultar no crescimento de 15 a 20% no número de transplantes realizados pelo SUS. Apesar do número de transplantes ter aumentado no Brasil e em todo o mundo nos últimos anos, o número de pacientes em lista de espera também tem crescido em uma taxa exponencial (GALLIFORD & GAME, 2009; BRASIL, 2010).

O sucesso das cirurgias realizadas, a introdução de novos agentes imunossupressores e os avanços alcançados com a terapia pós-transplante, proporcionaram uma redução expressiva da incidência de rejeição aguda pós-transplante, principalmente no primeiro ano após a cirurgia, que diminuiu para cerca de 10% nos últimos 10 anos, contribuindo para maior sobrevida do órgão transplantado e do paciente. Entretanto, a disfunção crônica e a perda do rim transplantado a longo prazo continuam sendo os principais problemas pós-transplante (GALLIFORD & GAME, 2009; ABTO, 2010; COOPER & WISEMAN, 2010).

O Ministério da Saúde e a ABTO divulgam anualmente a estimativa de sobrevida dos pacientes transplantados renais no Brasil. Estes dados contemplam apenas as equipes que informam 100% da evolução de seus pacientes. No ano de 2010, a sobrevida dos pacientes que receberam o rim de doadores vivos foi de 98% imediatamente após o transplante e a sobrevida do rim transplantado, neste mesmo grupo de pacientes, foi de 95%, no final do primeiro ano pós-transplante. A sobrevida dos pacientes que receberam o transplante renal de doadores falecidos e a sobrevida do rim, no final do primeiro ano pós-transplante, foi de 94 e 89%, respectivamente. A realização do transplante renal com doadores vivos é considerada, portanto, a melhor alternativa a curto e longo prazo, com resultados mais favoráveis no pós-transplante, comparando-se com os doadores falecidos. No

entanto, os potenciais prejuízos para o doador vivo, com a retirada de um rim devem ser considerados (GALLIFORD & GAME, 2009; ABTO, 2010; COOPER & WISEMAN, 2010; FERREIRA et al., 2011).

Para receber o transplante renal, os portadores de insuficiência renal crônica precisam passar por um processo criterioso de seleção, que identifica aqueles pacientes que são candidatos ao transplante. Este procedimento é necessário, pois se trata de um processo cirúrgico complexo e é preciso cautela na indicação do transplante para pacientes de alto risco. Pacientes idosos, portadores de doenças vasculares sistêmicas, de hepatite crônica e/ou outros processos infecciosos, bem como portadores de neoplasias, cardiopatias e hipersensibilizados são considerados receptores de alto risco (HARTMANN & WU, 2010).

A primeira etapa de preparação do receptor consiste em levantar detalhadamente sua história clínica e familiar por meio de anamnese criteriosa e exame físico detalhado. Além disso, é realizada uma série de exames laboratoriais, radiológicos, cardiológicos e psicológicos (BARROS et al., 2006).

Sabendo que o órgão transplantado representará uma carga antigênica importante para o receptor, após a realização do transplante, a grande preocupação é evitar a reação de rejeição ao enxerto.

### **2.3.2 Imunologia do transplante renal**

O transplante de órgãos é uma condição clínica na qual o sistema imunológico possui enorme importância. A resposta imunológica contra um órgão transplantado é uma barreira potencial ao sucesso da cirurgia e o conhecimento de como suprimir essa resposta permanece como alvo principal das pesquisas nesta área (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

A reação imunológica ao rim transplantado inicia pelo reconhecimento de aloantígenos, quando linfócitos T reconhecem antígenos não-próprios no enxerto, por meio de seu receptor de membrana, chamado receptor de célula T (TCR). Este reconhecimento pode ser feito por apresentação direta ou indireta de aloantígenos e é mediado por uma variedade de leucócitos, incluindo macrófagos, células T citotóxicas (CD8+), auxiliares (CD4+) e plasmócitos. Estas células envolvem-se em uma cascata de eventos, na qual citocinas pró-inflamatórias e reguladoras desempenham um papel importante, que culminará com a expansão clonal de

células efetoras e produção de anticorpos anti-HLA com atividade citotóxica. Quando a reação inflamatória não é modificada por agentes imunossupressores, esse tipo de resposta resulta em lesão e destruição do enxerto renal (BARROS et al., 2006; PONTICELLI, 2012). Além das interações celulares, mediadas por células T, os mecanismos de rejeição também envolvem diversas alterações humorais, conhecidas como rejeição mediada por anticorpos. O processo de rejeição ao rim transplantado envolve reações inflamatórias repetidas e constitui a principal causa de disfunção do enxerto no pós-transplante recente e tardio (ABBAS; LICHTMAN, 2007; SEMENTILLI et al., 2008).

Os aloantígenos de enxertos renais, que constituem alvos para a rejeição, são proteínas codificadas pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC). O MHC é formado por um conjunto de genes de importância fundamental para a resposta imunológica a antígenos protéicos. Nos seres humanos, este conjunto de genes foi denominado sistema HLA (*Human Leukocyte Antigen* ou Antígenos Leucocitários Humanos) (VOLTARELLI et al., 2009).

O MHC humano está localizado no braço curto do cromossomo 6 e os genes do sistema HLA são denominados Hla classe I (lócus A, B e C), Hla classe II (lócus DR, DP e DQ) e Hla classe III [proteínas C2 e C4 do complemento, fator de necrose tumoral (TNF-) e linfotoxinas]. O MHC humano é um sistema antigênico complexo, com alto grau de polimorfismo, de grande importância na imunologia de transplante de órgãos e na resposta imune. Devido ao alto grau de polimorfismo, a nomenclatura HLA foi padronizada e segue as seguintes normas: as duas primeiras letras referem-se ao lócus em consideração, a terceira letra define o tipo de cadeia codificada pelo gene (A para cadeias alfa e B para cadeias beta), o número final indica qual é o gene considerado. Assim, a expressão HLA-DRB1 significa HLA lócus DR, cadeia beta, gene 1 (VOLTARELLI et al., 2009).

A incompatibilidade de antígenos HLA ou a formação de anticorpos contra esse sistema são, portanto, os principais fatores envolvidos na gênese das rejeições. Existem dois tipos clínicos principais de rejeição, aguda e crônica. Além dessas, outras subclassificações, como a rejeição hiperaguda, acelerada e subclínica também são utilizadas clinicamente (BARROS et al., 2006).

### **2.3.2.1 Anticorpos anti-HLA e reatividade contra painel de linfócitos (PRA)**

Os anticorpos anti-HLA são produzidos especificamente contra aloantígenos do doador, desempenham um papel importante na sobrevida do enxerto renal e estão associados tanto à rejeição inicial pós-transplante, quanto à perda tardia da função do enxerto. Está bem estabelecido que estes anticorpos estão pré-formados no paciente receptor do transplante renal, principalmente nos casos de hemotransfusões repetidas, transplante prévio e gravidez ou podem surgir após a realização do transplante. Por esta razão, a pesquisa de incompatibilidades HLA ou *crossmatch* é realizada pré-transplante para detecção precoce desses anticorpos. A existência de anticorpos anti-doador no pré-transplante renal está associada ao desenvolvimento dos processos de rejeição hiperaguda e aguda (TAIT, 2009). Mas, estes também têm sido associados à rejeição crônica ao enxerto renal (CAI; TERASAKI, 2008).

A rejeição aguda, mediada por anticorpos, constitui uma forma rara deste tipo de rejeição, mas é considerada bastante grave e geralmente associada à perda do enxerto. A rejeição mediada por anticorpos ocorre com mais frequência em pacientes previamente sensibilizados ou com história anterior de transplante (re-transplante). Há uma expectativa clínica de que a rejeição mediada por anticorpos aumente nos próximos anos, devido ao maior conhecimento adquirido sobre este tipo de rejeição e, portanto, maior capacidade de fazer este diagnóstico. Além disso, o maior número de transplantes renais realizados, receptores com anticorpos pré-formados ou transplantes realizados com alta incompatibilidade HLA, também poderão contribuir para o aumento do processo de rejeição mediada por anticorpos (FERREIRA et al., 2011; PONTICELLI, 2012).

A rejeição mediada por anticorpos (aguda ou crônica) é um processo sequencial, iniciada geralmente por anticorpos específicos anti-doador, que resultam na lesão endotelial, estreitamento da parede arterial, lesão ao parênquima renal e finalmente, disfunção do enxerto (CAI; TERASAKI, 2008).

O exame para investigação da presença de anticorpos anti-HLA no soro do receptor, utilizando um painel de linfócitos T e/ou B com ampla representatividade de antígenos HLA, é conhecido como reatividade contra painel (PRA - *panel reactive antibodies*). A técnica clássica utilizada para determinação do PRA tem sido o teste da microlinfotoxicidade ou CDC (citotoxicidade dependente de complemento),

descrita por Terasaki e McClelland em 1964. Esta metodologia consiste na incubação de células mononucleares (linfócitos), coletadas do sangue periférico do doador, com o soro do receptor. Após esta primeira incubação, é acrescentado soro de coelho como fonte de complemento. Se a reação antígeno-anticorpo tiver ocorrido na superfície das células do doador, o complemento será ativado, provocando a lise das células. O resultado da reação é evidenciado pela adição de um corante supra-vital, geralmente a eosina, que penetra nas células mortas, mas é incapaz de penetrar nas células com membrana íntegra. A leitura ao microscópio permite a identificação e a quantificação das células mortas, entre zero e 100% (ABBAS; LICHTMAN, 2007). O desenvolvimento de técnicas utilizando ELISA e citometria de fluxo aumentou a sensibilidade e a especificidade do teste PRA. O PRA por ELISA, assim como por citometria de fluxo, identifica anticorpos não fixadores de complemento e, portanto, é mais sensível que a CDC. Além disso, o PRA por ELISA também permite distinguir entre os anticorpos anti-HLA classes I e II (McKENNA, TAKEMOTO, TERASAKI, 2000; MANSOUR et al., 2001; DUBOIS et al., 2002).

### **2.3.2.2 Rejeição aguda**

A rejeição aguda (RA) ao transplante renal é um evento que ocorre, em geral, entre cinco dias a três meses após a realização da cirurgia, mas pode ocorrer em qualquer época após o transplante. A RA é considerada a principal causa de falha precoce do enxerto e consiste em um processo inflamatório complexo, influenciado pelo sistema imune inato e adaptativo do receptor e pela ineficácia da terapia imunossupressora (KLAUS et al., 2001).

No transplante renal, a ocorrência de um ou mais episódios de rejeição aguda normalmente é mediada por células T ativadas, que infiltram o órgão transplantado. Os neutrófilos e monócitos circulantes, bem como os macrófagos teciduais, também possuem um papel decisivo no início da resposta imune inflamatória aguda. Durante este processo, os monócitos migram em direção ao enxerto, juntamente com as células T, determinando o aparecimento das características principais da rejeição aguda, que são a tubulite e o infiltrado mononuclear intersticial.

Os achados histológicos na RA incluem nefrite intersticial, com edema do rim e infiltrado cortical por linfócitos, pró-linfócitos, linfoblastos, macrófagos e eosinófilos.

Os processos mediados por células T são classificados como rejeição aguda dos tipos I e II. A rejeição aguda do tipo I é caracterizada por tubulite e infiltrado linfomononuclear (rejeição tubulointersticial) e a do tipo II, por arterite intimal (rejeição vascular). No entanto, esses dois processos podem ser observados simultaneamente (COLVIN, 2009).

As alterações vasculares, reconhecidas à histologia, são definidas pela presença de edema endotelial dos capilares glomerulares e peritubulares, arterite intimal, inflamação transmural ou necrose da parede arterial (COLVIN, 2009).

A rejeição aguda também pode ser mediada por anticorpos. Neste caso, imunoglobulinas das classes M (IgM) e G (IgG) ativam a via clássica do complemento, atraindo neutrófilos, levando à formação do complexo de ataque às membranas celulares (C5b-9) e à deposição do complexo C4d. Esta forma de rejeição aguda é classificada como tipo III e é caracterizada por arterite transmural ou necrose fibrinóide da camada média da artéria, com formação de agregados plaquetários e acúmulo de fibrina e de proteínas plasmáticas na parede do vaso.

A presença de coágulos de fibrina é um sinal de mau prognóstico quanto à reversibilidade da rejeição. A histologia é muito variável para cada paciente e pode apresentar-se normal, com a presença de depósitos da fração C4d do complemento, que classifica o componente humoral, passando por alterações discretas, até a presença de infiltrado inflamatório denso com agressão tubular, glomerulite aguda, edema do endotélio de capilares glomerulares e peritubulares, agregados de plaquetas, deposição de fibrina e capilarite peritubular (SOLEZ et al., 2008).

### **2.3.2.3 Rejeição crônica**

A rejeição crônica (disfunção crônica do enxerto) caracteriza-se por uma progressão de alterações celulares e humorais, que podem ocorrer em poucas semanas ou anos após o transplante renal. Clinicamente, há um aumento progressivo da concentração de creatinina plasmática e proteinúria, avançando gradualmente para a DRC. A rejeição crônica (RC) é a principal causa de perda tardia do transplante renal. Seu desenvolvimento é heterogêneo e sofre influências de causas imunológicas e não-imunológicas (MORESO et al., 2006; SOLEZ et al., 2008).

A RC é um processo lento que resulta na substituição do parênquima renal normal por tecido cicatricial fibroso. As alterações histológicas principais incluem glomerulopatia crônica do transplante (alterações glomerulares), arteriopatia crônica do enxerto (alterações vasculares), fibrose intersticial e atrofia tubular (alterações tubulointersticiais).

A RC tem vários graus, desde fibrose intersticial e atrofia tubular leves (FIAT-leve) a graus mais avançados de lesão. O exame histológico revela que todos os componentes do parênquima renal estão envolvidos, com diminuição do tamanho do glomérulo e espessamento da membrana basal glomerular; proliferação da camada íntima e alterações degenerativas da camada média dos vasos, com obliteração dos capilares peritubulares; proeminente fibrose intersticial, com focos de infiltração linfomonocitária, atrofia tubular, com obliteração luminal; expansão da matriz e aterosclerose do rim (MORESO et al., 2006; SOLEZ et al., 2008).

O desenvolvimento da rejeição crônica parece depender de três eventos principais: a lesão endotelial, a liberação de citocinas e a resposta imunológica inflamatória mediada por células e por anticorpos (BALUJA et al., 2006). Quando mediada por anticorpos, duplo contorno irregular no glomérulo e/ou múltiplas camadas de membrana basal peritubular com FIAT, espessamento da íntima do vaso e deposição de C4d são detectados na histologia. A lesão ao endotélio pode ser causada pela presença de anticorpos anti-antígenos endoteliais, microangiopatia trombótica e diabética, toxicidade das drogas imunossupressoras e hipertensão arterial. A produção aumentada de algumas citocinas/quimiocinas tem sido associada à evolução da rejeição crônica e essas parecem desempenhar um papel importante no desenvolvimento das lesões inflamatórias crônicas (HU & KNETCHLE, 2006; SEMENTILLI et al., 2008).

De acordo com o perfil de citocinas produzidas, é possível diferenciar dois tipos de resposta imune, inflamatória ou reguladora. Os linfócitos envolvidos na resposta inflamatória produzem interleucina 2 (IL-2), interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral do tipo alfa (TNF- $\alpha$ ). Por meio da ativação de macrófagos, estes linfócitos participam da resposta do tipo hipersensibilidade tardia e da atividade citotóxica. Os linfócitos envolvidos na resposta reguladora produzem as interleucinas IL-4, IL-5 e IL-10, auxiliando na resposta de linfócitos B e na produção de anticorpos (MANZANO et al., 2005; PEREIRA et al., 2009).

Sementilli et al., 2008, observaram que cerca de 18% dos pacientes transplantados renais desenvolvem anticorpos contra os antígenos leucocitários humanos (anti-HLA). Estes pesquisadores admitiram que a rejeição mediada por anticorpos tem importância considerável nos casos de rejeição crônica, quando são detectados anticorpos específicos do receptor contra os antígenos HLA do doador.

O alorreconhecimento de antígenos HLA incompatíveis do doador é o evento central que inicia o processo de rejeição crônica. O reconhecimento e a apresentação destes antígenos ocorre por três vias diferentes, direta, indireta e semi-direta. Na via direta, as células T do receptor reconhecem os antígenos HLA na superfície das células apresentadoras de antígenos alogeneicas (do doador). Na via indireta, as células T reconhecem aloantígenos processados e apresentados como peptídeos pelas células apresentadoras de antígeno singeneicas (do receptor). A via semi-direta, descrita recentemente, ainda precisa ser plenamente caracterizada, mas acredita-se que envolva células apresentadoras de antígenos do receptor e doador. A participação de todas as vias pode ocorrer desde a fase precoce de rejeição ao enxerto, mas acredita-se que na rejeição aguda a via direta tenha um papel fundamental. Por outro lado, na rejeição crônica e/ou processos imunológicos mais tardios, o alorreconhecimento indireto parece ser o mais importante (NATH; BASHA; MOHANAKUMAR, 2010).

A patogênese da rejeição crônica é um processo multifatorial, sequencial, com fatores imunológicos e não imunológicos, que possuem um papel sinérgico no desenvolvimento da lesão ao enxerto (Figura 4).

Um acompanhamento da função renal, o controle dos fatores de risco e a individualização adequada da terapia imunossupressora permanecem como a melhor alternativa para evitar a perda tardia do órgão e aumentar a sobrevida do aloenxerto e do paciente (BALUJA et al., 2006).

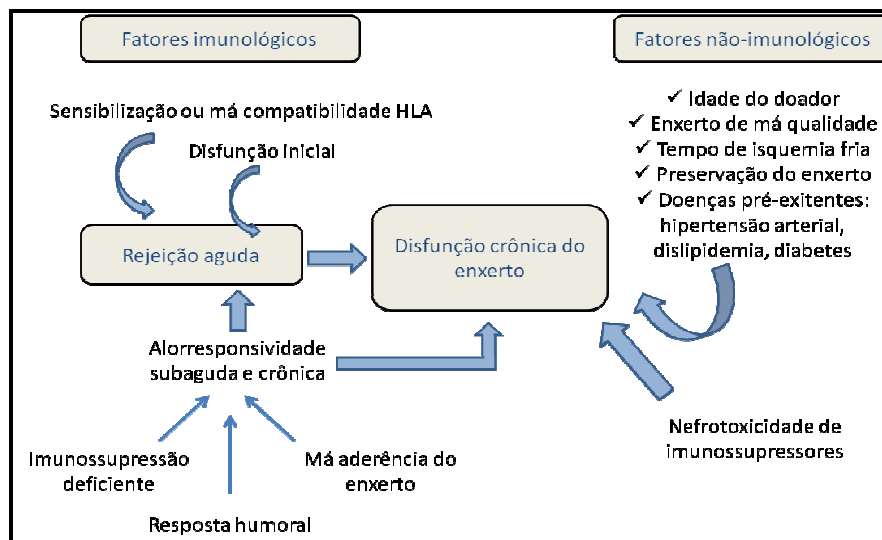


Figura 4 - Esquema integrado da patogênese do desenvolvimento da disfunção crônica do enxerto (rejeição crônica), adaptado de Barros et al., 2006.

#### **2.3.2.4 Classificação histopatológica das rejeições (critério Banff)**

A classificação Banff da patologia associada ao transplante renal teve início em 1991 e tornou-se o padrão de maior expressão na classificação histopatológica das complicações pós-transplante. As reuniões para a classificação Banff também estabeleceram diretrizes para a maioria das outras áreas de transplante de órgãos e pretendem incorporar cada vez mais cursos de formação e grupos de trabalho. A classificação Banff tem reconhecimento global e visa determinar a presença de rejeição e de outras doenças importantes após o transplante renal (SOLEZ et al., 2008).

A grande vantagem da classificação Banff é sua estrutura organizada, capaz de criar um consenso mundial sobre o diagnóstico das lesões histológicas de rejeição ao enxerto renal. Os pontos fracos desta classificação são a ausência de um padrão externo para testar e comprovar a sua eficácia e a sua dependência quase exclusiva da histopatologia, que possui limitações inerentes à coleta das amostras (biópsia) e à reprodutibilidade intra e inter-observador (MENGEL et al., 2007).

A 10ª Conferência Banff sobre a patologia do transplante foi realizada no período de 09 a 14 de agosto de 2009, na cidade de Banff, estado de Alberta, no Canadá e a 11ª Conferência Banff foi realizada em Paris, França, no período de 05 a

10 de junho de 2011. Um total de 288 patologistas, clínicos, cirurgiões, imunologistas e pesquisadores de mais de 30 países discutiram aspectos relevantes para os diversos tipos de transplantes de órgãos. Estas duas últimas conferências regem as classificações histopatológicas utilizadas nas análises das biópsias de órgãos transplantados. Os principais objetivos das conferências Banff são esclarecer as respostas imunes mediadas por anticorpos, investigar o papel do endotélio vascular na rejeição, favorecer a determinação de marcadores de rejeição não invasivos e oferecer atualizações sobre os transplantes de rim, pâncreas, coração, fígado, pulmão e tecidos (SIS et al., 2010; MENGEL et al., 2012).

Morfologicamente, as principais características da rejeição crônica e a gravidade destes achados podem ser classificadas histologicamente segundo as categorias de Banff para as patologias dos aloenxertos renais. As categorias diagnósticas de Banff obedecem aos seguintes critérios de classificação:

1. Normal – biópsia histologicamente normal;
2. Alterações mediadas por anticorpos – incluem a presença de anticorpos circulantes anti-doador, deposição de C4d ou patologia do enxerto;
3. Alterações *Borderline* – esta categoria inclui focos de tubulite intersticial, com presença de arterite;
4. Rejeição mediada por células – rejeição aguda mediada pelas células T ou rejeição crônica mediada pela ativação precoce das células T, com arteriopatia crônica do enxerto;
5. Fibrose intersticial/Atrofia tubular (FIAT) sem evidências de uma etiologia específica;
6. Outras alterações, não atribuíveis à rejeição aguda ou crônica. Esta categoria inclui a hipertensão crônica, toxicidade por drogas imunossupressoras, obstrução renal crônica, pielonefrite e infecções virais (SEMENTILLI et al., 2008; SOLEZ et al., 2008).

As próximas conferências Banff estão previstas para o México ou Brasil em 2013 e Suécia, em 2015 (SOLEZ, 2010).

### **2.3.2.5 Citocinas reguladoras e pró-inflamatórias**

As citocinas são proteínas solúveis, de baixo peso molecular, produzidas geralmente em resposta a um estímulo antigênico e funcionam como mensageiros

químicos para o sistema imune inato ou adaptativo. Geralmente, as citocinas são liberadas de uma célula para ativarem receptores transmembrana em outras células responsivas, embora algumas moléculas possam apresentar atividade intracelular na própria célula de origem (LUHESHI; ROTHWELL; BROUGH, 2009).

A interleucina 8 (IL-8) é uma quimiocina da família CXC, também denominada CXCL8, com ação quimiotática potente para neutrófilos e células T. Sua síntese é normalmente induzida por interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ). A IL-8 é uma citocina pró-inflamatória de fase aguda, com importante papel nas infecções, tumores e na rejeição ao transplante (DILLER et al., 2003). A IL-8 também pode estimular a liberação de grânulos de neutrófilos, com potencial lesão ao tecido inflamado (SEGERER; NELSON; SCHLONDORFF, 2000).

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória sintetizada por células fagocíticas mononucleares (monócitos e macrófagos), células endoteliais e fibroblastos. Em diversas células, a síntese de IL-6 é dependente da estimulação prévia por IL-1 e, em menor extensão, por TNF- $\alpha$ . A IL-6 estimula a síntese de proteínas inflamatórias, como a proteína C reativa (PCR) e também atua sobre os linfócitos B, ativando sua diferenciação em plasmócitos (VOLTARELLI et al., 2009).

A IL-6 é considerada um citocina multifuncional, envolvida na regulação da resposta imune, na resposta de fase aguda, hematopoese e inflamação. Na imunidade inata, a IL-6 regula o tráfico de leucócitos e induz a produção de proteínas de fase aguda, ainda promove a proliferação de células T, a diferenciação de células B e a produção de imunoglobulinas (AKDIS et al., 2011).

A interleucina 1 (IL-1) foi descrita pela primeira vez como uma proteína capaz de induzir a febre, constituída por duas grandes cadeias protéicas, sendo IL-1 $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Existem cerca de 11 diferentes citocinas pertencentes à família IL-1. IL-1 $\beta$  é frequentemente descrita como a citocina pró-inflamatória mais significativa desta família (AKDIS et al., 2011). A IL-1 $\beta$  estimula diretamente o mecanismo de resposta imunológica do hospedeiro e possui efeitos sobre a produção de proteínas de fase aguda, os genes reguladores da produção de citocinas e sobre o remodelamento tecidual por ativação de enzimas. A IL-1 $\beta$  é um importante mediador da resposta imune inata, estimula a neutrofilia e a infiltração de leucócitos circulantes em tecidos inflamados. Também desempenha um papel importante na resposta imune

adaptativa, estimulando o amadurecimento de linfócitos ativados (LUHESHI; ROTHWELL; BROUGH, 2009).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida por monócitos e macrófagos ativados e possui um amplo espectro de ação. Suas principais funções incluem a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, ativação plaquetária e participação na gênese da anemia, da caquexia e da febre (KARCZEWSKI et al., 2008). O TNF- $\alpha$ , assim como a IL-6, promove a proliferação de células T e é capaz de interferir negativamente na tolerância imunológica aos transplantes (SHEN; GOLDSTEIN, 2009). O TNF- $\alpha$  tem sido considerado uma citocina reguladora mestre, com papel central tanto na resposta pró-inflamatória, quanto anti-inflamatória, porém seu papel pró-inflamatório parece ser mais significativo, pois seu excesso pode ser extremamente tóxico e fatal para as células. Níveis elevados de TNF- $\alpha$  parecem contribuir também para a resistência periférica à insulina e para a disfunção endotelial (STENVINKEL et al., 2005).

A interleucina 12 (IL-12) é uma citocina pró-inflamatória, produzida por monócitos ativados, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células da microglia. A IL-12 estimula a produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) por células TH1 e natural killer (NK) e, desta forma, contribui para o desenvolvimento e manutenção dessas células. A IL-12 também é capaz de ativar a capacidade antibacteriana, antiparasitária e antitumoral de macrófagos, bem como promover a atividade citolítica de células NK (AKDIS et al., 2011). Após a realização dos transplantes, a utilização de drogas imunossupressoras pode suprimir a produção de IL-12 por células dendríticas, enquanto a produção de interleucina 10 (IL-10) parece aumentar com o uso dessa terapia (DANIEL, et al., 2005).

O interferon gama (IFN- $\gamma$ ) é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, células NK, linfócitos T citotóxicos e linfócitos B. Possui atividade antiviral, imunomoduladora e ativadora de macrófagos. O IFN- $\gamma$  é utilizado terapeuticamente em pacientes com infecções ativas, em combinação com a terapia antimicrobiana convencional (VOLTARELLI et al., 2009). Níveis elevados de IFN- $\gamma$  são expressos por células Th1, estimulando a atividade citotóxica em outras células e induzindo a apoptose de células epiteliais. O IFN- $\gamma$  também regula a expressão das moléculas de MHC das classes I e II, bem como a apresentação de antígenos. É

capaz de produzir respostas inibitórias, tais como a inibição do crescimento celular e a modulação da resposta imune (AKDIS et al., 2011).

A interleucina 4 (IL-4) é sintetizada por linfócitos T CD4+, sendo necessária para a produção de imunoglobulinas, principalmente do tipo E (IgE). Estimula o crescimento e a diferenciação de células T, especialmente os linfócitos Th2, a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, é capaz de suprimir as respostas imunes mediadas por células e as respostas humorais (VOLTARELLI et al., 2009). A IL-4 também é conhecida como fator estimulante de células B, citocina moduladora ou reguladora da resposta imune. Existem dois tipos de receptores para IL-4, sendo IL-4R tipo I, expresso em células hematopoiéticas e células T e IL-4 tipo II, expresso em células hematopoiéticas e não-hematopoiéticas, mas que não é expresso em células T. A presença dos receptores celulares constitui o principal alvo de atuação reguladora desta citocina. A IL-4 também é produzida, em menor escala, por eosinófilos, basófilos e mastócitos e tem um papel decisivo na regulação das condições alérgicas, estimulando a resposta Th1 e suprimindo a resposta Th2. Ainda contribui para o aumento da expressão de moléculas MHC classe II, atua como co-agente mitogênico para linfócitos B, induz a expressão de moléculas de adesão à célula vascular (VCAM-1) na superfície de células endoteliais e modula a resposta inflamatória (AKDIS et al., 2011). Clinicamente a IL-4 inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  e, portanto, desperta o interesse clínico para o monitoramento de doenças inflamatórias e autoimunes (AKDIS et al., 2011).

A interleucina 5 (IL-5) foi descrita pela primeira vez como um fator de crescimento para eosinófilos e linfócitos B, em 1987. É uma citocina reguladora da resposta imune, que possui como células alvo os eosinófilos, os basófilos e os mastócitos. A IL-5 possui efeito sinérgico com a IL-4, aumentando a adesão de células inflamatórias, principalmente eosinófilos, às células endoteliais. A interação de eosinófilos ativados com fibroblastos é capaz de induzir a proliferação e a expansão da matriz celular. Por essas razões, acredita-se que a IL-5 tenha um papel significativo na cicatrização de feridas e no remodelamento dos tecidos (LIANG et al., 2006; WOLK et al., 2006; AKDIS et al., 2011).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina reguladora da resposta imune, que possui a função fisiológica principal de controlar a inflamação mediada por linfócitos Th1. A imunossupressão é considerada o papel principal dessa interleucina (KARCZEWSKI et al., 2008). A IL-10 é produzida principalmente por monócitos,

linfócitos T e B, macrófagos e células NK. Afeta diretamente a função das células apresentadoras de antígenos, reduzindo a expressão de moléculas MHC classe II e de moléculas co-estimulatórias, presentes na superfície de monócitos e macrófagos. A IL-10 também é capaz de inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e de seus receptores. Por outro lado, induz a produção de IgG, a proliferação de células B e contribui para aumentar a sobrevivência dessas células no sangue periférico. Embora os mecanismos responsáveis pela tolerância imunológica ainda permaneçam em constante estudo, acredita-se que a IL-10 tenha papel decisivo no desenvolvimento da imunotolerância (AKDIS et al., 2011).

Na etapa de indução da resposta inflamatória do transplante renal, células apresentadoras de antígenos, linfócitos T ativados e células NK, na presença de IL-12, IL-18 e TNF- $\alpha$ , resultam no aumento da produção de células Th1 (CARDONI et al., 2005).

#### **2.3.2.6 Marcadores inflamatórios na rejeição ao transplante renal**

A monitorização de marcadores inflamatórios após o transplante renal tem sido proposta como um incremento na sensibilidade dos métodos utilizados atualmente para o diagnóstico da rejeição. A descoberta de novos marcadores capazes de indicar a ocorrência de rejeição, antes do surgimento da disfunção do órgão, e o estabelecimento de parâmetros para ajustes na imunossupressão são os objetivos de todos os pesquisadores e profissionais da saúde envolvidos com o transplante renal (PEREIRA et al., 2009).

A rejeição ao enxerto renal está associada à resposta imune ativada, modulada por citocinas e células. Estudos anteriores determinaram níveis de citocinas no plasma e na urina em vários estados de disfunção renal pós-transplante, no entanto, a maioria deles avaliou esses parâmetros apenas nos períodos recentes pós-transplante ou nos casos de rejeição aguda (DILLER et al., 2003; JIMENEZ et al., 2005; DANIEL et al., 2005; KARCZEWSKI et al., 2008; REINHOLD et al., 2012). São escassos na literatura os estudos visando determinar a associação de citocinas e lesões crônicas/tardias ao enxerto renal (DILLER et al., 2003; BARRETO et al., 2010; De SERRES et al., 2011).

Níveis plasmáticos e urinários elevados de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-6 e IL-8 parecem possuir um valor preditivo positivo para risco de falência

renal e poderiam ser utilizados como marcadores de risco para a rejeição ao rim transplantado. Além disto, a IL-8 também possui quimiotaxia para células inflamatórias (HU & KNETCHLE, 2006). Um estudo recente detectou uma correlação positiva entre os níveis elevados de IL-6 e a disfunção tardia do enxerto renal (BARRETO et al., 2010)

Abedini et al., 2009 mostraram que a inflamação e a ativação do sistema imunológico desempenham um papel importante em pacientes transplantados renais, principalmente no que diz respeito à mortalidade cardiovascular. Diversas citocinas induzem a produção hepática de IL-6 e essa estimula a produção de reagentes inflamatórios, tais como a proteína C reativa (PCR). A elevação plasmática discreta e contínua de PCR, detectada pelo método ultra-sensível, é considerada um fator de risco independente para eventos cardiovasculares. Desta forma, a produção aumentada de IL-6 também poderia ser considerada um fator de risco associado. Células parenquimatosas renais podem produzir IL-6 e TNF- $\alpha$  em diversas condições patológicas. O aumento de TNF- $\alpha$  é encontrado, por exemplo, na infiltração celular por macrófagos, que aparece associada à rejeição aguda ao enxerto. Durante os episódios de rejeição aguda, a expressão de TNF- $\alpha$  aumenta expressivamente em células epiteliais tubulares renais, entretanto a participação de TNF- $\alpha$  a longo prazo, no transplante renal, ainda não está totalmente esclarecida (BOUCHER, GOGUSEV, DROZ, 1993).

Por outro lado, a IL-10 parece contribuir para a sobrevivência do enxerto renal e para a imunotolerância. Esta citocina reguladora inibe a produção de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  e, desta forma, parece desempenhar um papel antiinflamatório no transplante renal (BROMBERG, 1995). O equilíbrio entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras parece ser o evento imunológico mais importante na aceitação do enxerto renal ou no desenvolvimento da rejeição. O aumento da produção de IL-10, em resposta à estimulação alogênica, seria, na maioria dos casos, um marcador importante da tolerância imunológica ao enxerto (CARDONI et al., 2005).

Durante o período recente pós-transplante é esperado que o sistema imunológico do receptor adapte-se à presença do enxerto. Este mecanismo de adaptação é conhecido como tolerância imunológica e permite a redução da dose de drogas imunossupressoras, principalmente nos dois primeiros anos pós-transplante.

Os mecanismos de tolerância ainda não estão totalmente esclarecidos, mas acredita-se que alterações de células dendríticas e um balanço na produção de citocinas possam contribuir para o estabelecimento da aceitação do enxerto. As drogas imunossupressoras contribuem para a indução de células dendríticas do tipo 2 (linfóides), estimulam a produção de IL-10 e suprimem a produção de IL-12. Além disso, células dendríticas e linfócitos T helper parecem regular um ao outro com a contribuição do balanço entre IL-4, IL-10 e IL-12 (DANIEL et al., 2005).

Um estudo recente detectou que monócitos ativados no sangue periférico secretam citocinas pró-inflamatórias em pacientes transplantados renais, com glomerulopatia do transplante. Os autores encontraram níveis elevados de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  em pacientes com glomerulopatia pós-transplante recente, mas não encontraram associação dessas citocinas com lesões crônicas ou com a presença de anticorpos anti-HLA pós-transplante tardio (De SERRES et al., 2011).

## **2.4 Hemostasia**

A hemostasia é um processo fisiológico dinâmico que visa manter o sangue fluido no interior dos vasos, prevenindo a hemorragia ou a trombose. Quando ocorre lesão de um vaso sanguíneo e extravasamento de sangue, uma sequência de eventos é iniciada, objetivando interromper o sangramento. Estes eventos incluem vasoconstrição reflexa e localizada, que visa diminuir o fluxo sanguíneo no local da lesão; ativação de plaquetas e formação de um tampão plaquetário primário; ativação dos fatores da coagulação e formação de um coágulo estável de fibrina; recuperação da parede vascular lesada; lise do coágulo de fibrina e restabelecimento do fluxo sanguíneo normal no leito vascular. Os componentes do sistema hemostático incluem o endotélio vascular, as plaquetas, os fatores da coagulação, os anticoagulantes naturais e o sistema fibrinolítico (COLVIN, 2004).

### **2.4.1 Endotélio vascular**

O endotélio vascular é constituído por uma monocamada de células que revestem o interior dos vasos. Em decorrência das diversas funções que desempenha e do reconhecimento de que a lesão e a disfunção endoteliais podem gerar inúmeras consequências em várias doenças, o endotélio vascular é,

atualmente, considerado um órgão. As células endoteliais se encontram diretamente em contato com o sangue circulante e cerca de 80% dessas células revestem os capilares. O endotélio regula a permeabilidade vascular e participa da modulação vasomotora, inflamatória e hemostática (MOLITORIS; SUTTON, 2004; FLISER, 2010).

As células endoteliais possuem diferentes características morfológicas e funcionais nos mais variados leitos vasculares. A perda de suas funções vitais ou a perda da integridade vascular podem contribuir para o desenvolvimento ou para o agravamento de diversas doenças, tais como o diabetes mellitus, a hipertensão arterial e a doença renal (MOLITORIS; SUTTON, 2004; FLISER, 2010).

O envolvimento do endotélio em praticamente todas as doenças reflete sua participação como determinante primário dos mecanismos fisiopatológicos ou pode ser alvo das lesões provocadas pelos estados patológicos (AIRD, 2008).

As funções endoteliais diferem devido à sua enorme área de superfície, à sua heterogeneidade morfológica e funcional e à sua elevada especialização em diferentes leitos vasculares. No sistema renal, por exemplo, a função endotelial difere bastante dos demais locais, pois mesmo em vasos sanguíneos semelhantes, como nos capilares glomerulares e peritubulares, as funções do endotélio são diferentes, devido às características das células endoteliais nessas regiões, que são muito ativas metabolicamente (FLISER, 2010).

A forma das células endoteliais também varia de acordo com o leito vascular. Embora sejam células tipicamente planas, podem apresentar formato cúbico, retangular e espessuras variadas. A espessura das células endoteliais pode variar desde menos de 0,1 micra em capilares e veias até 1,0 micra na artéria aorta. Normalmente as células endoteliais respondem à pressão hemodinâmica de cisalhamento do sangue e se alinham na direção do fluxo sanguíneo. Esta característica auxilia no remodelamento do endotélio em casos de lesões ao vaso. Adicionalmente, em resposta à inflamação, as células endoteliais apresentam-se mais ativas e demonstram um aumento da permeabilidade vascular. As células do endotélio são ainda capazes de realizar endocitose e transcitose (transferência transcelular de moléculas) como mecanismos protetores para a estrutura endotelial (AIRD, 2007a; AIRD, 2007b).

O endotélio vascular pode ser contínuo (fenestrado ou não fenestrado) ou descontínuo. O endotélio não fenestrado é encontrado em artérias, veias e capilares

do cérebro, pele, coração e pulmões. O endotélio fenestrado, por sua vez, é encontrado em locais onde ocorre filtração ou transporte transendotelial, como nos capilares de glândulas endócrinas, mucosa gástrica, glomérulos e túbulos renais. O endotélio descontínuo é encontrado em capilares sinusóides do fígado. Em contraste com o endotélio fenestrado, as células endoteliais dos capilares sinusóides possuem fenestrações ainda maiores, responsáveis por sua característica descontínua e por sua heterogeneidade (AIRD, 2007a; AIRD, 2007b).

As principais funções do endotélio são manutenção da fluidez do sangue e promoção da formação limitada do coágulo de fibrina, quando existe lesão vascular. As células endoteliais expressam componentes anticoagulantes, tais como o TFPI (inibidor da via do fator tissular), sulfato de heparan, EPCR (receptor endotelial para proteína C da coagulação), t-PA (ativador tecidual de plasminogênio), prostaciclina e NO (óxido nítrico). Também sintetizam substâncias pró-coagulantes, tais como o FT (fator tissular), PAI-1 (inibidor do ativador de plasminogênio tipo 1), FvW (fator von Willebrand) e receptores de proteases. As células endoteliais íntegras degradam rapidamente o ADP (adenosina difosfato) liberado pelas plaquetas agregadas, por ação da ADPase e sintetizam PGI<sub>2</sub> (prostaglandina I<sub>2</sub>) e NO, que inibem a reatividade plaquetária e induzem o relaxamento vascular (NAPOLI & IGNARRO, 2009; ANGIOLILLO; UENO; GOTO 2010). É importante salientar que a produção e a liberação de moléculas anticoagulantes ou pró-coagulantes, derivadas do endotélio, são bastante variáveis ao longo do leito vascular (AIRD, 2007a; AIRD, 2008).

Em resposta a estímulos agressivos, as células endoteliais são ativadas e modulam as suas propriedades no sentido de restaurar a homeostasia vascular. A ativação do endotélio está associada à liberação de componentes anticoagulantes e pró-coagulantes, de moléculas de adesão e de micropartículas para a circulação (RABELINK; BOER; van ZONNEVELD, 2010).

A disfunção endotelial constitui a perda rápida e temporária ou progressiva e permanente das funções das células do endotélio vascular. O comprometimento da síntese de NO, por exemplo, constitui uma disfunção endotelial e pode ter efeitos deletérios sobre a pressão arterial e sobre a adesão de leucócitos e plaquetas à superfície do vaso sanguíneo, alterações essas que podem contribuir para a gênese da doença vascular em geral. A exposição prolongada e repetida das células endoteliais a agentes tóxicos, infecciosos ou aterogênicos também pode levar à

exaustão dessas e, conseqüentemente, induzir uma disfunção (RIBEIRO et al., 2009).

O endotélio contribui, ainda, para a eficácia do sistema da anticoagulação natural. O sulfato de heparan, expresso pela superfície endotelial, catalisa a ligação trombina-antitrombina, formando o complexo Trombina-Antitrombina (TAT). Da mesma forma, a trombomodulina expressa pelo endotélio vascular, participa do mecanismo da anticoagulação natural, mediado pelas proteínas C e S (HOFFMAN, 2003; NORRIS, 2003).

O reconhecimento do papel do endotélio na doença renal ou o desenvolvimento de lesões vasculares em pacientes com doença renal resultou no aprimoramento de diferentes métodos para investigar a função do endotélio, incluindo os mecanismos de lesão e reparação (RABELINK; BOER; van ZONNEVELD, 2010).

Existem evidências de que a progressão da doença renal é caracterizada pela perda, também progressiva, do sistema microvascular. A perda da microvasculatura está associada ao desenvolvimento da lesão glomerular e tubulointersticial, na doença renal (KANG et al., 2002).

#### **2.4.1.1 Trombomodulina**

A trombomodulina (TM) é uma glicoproteína de membrana, presente na superfície das células endoteliais. Fisiologicamente, a TM participa do mecanismo da anticoagulação natural mediado pelas proteínas C e S, pois forma um complexo com a trombina, impedindo que essa exerça seu papel procoagulante. O complexo formado pela ligação da TM à trombina é capaz de ativar a proteína C (PCa) cerca de 1.000 vezes mais rápido que a trombina livre. A PCa, na presença de proteína S (PS), atenua a reação de coagulação pela quebra proteolítica e, conseqüentemente, por inativação dos fatores Va e VIIIa, o que limita a formação de trombina (LORENZI, 2006; KAVANAGH & GOODSHIP, 2010).

A via da PCa é descrita como um sistema capaz de fazer uma ligação entre a inflamação e a coagulação, pois cada componente dessa via pode exibir uma potente atividade antiinflamatória, além da função clássica de anticoagulação natural. A TM, o EPCR e a PCa, individualmente ou em conjunto, estão surgindo como controladores importantes da inflamação em diversos órgãos. Em particular, a

TM é capaz de inibir diretamente a adesão de leucócitos ao endotélio vascular ativado (D'ALESSIO, GENUA, VETRANO, 2012).

Adicionalmente ao endotélio, a TM também é expressa em células do músculo liso, plaquetas, monócitos e cardiomiócitos. A TM também foi encontrada em algumas células neoplásicas e acredita-se que a sua expressão nessas células possa influenciar o crescimento e a metástase tumoral, o que sugere que a função biológica da TM não está restrita à anticoagulação natural (HENG LI et al., 2012). Foi descrito também que citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1, podem diminuir a síntese fisiológica de TM em células endoteliais de animais (MOORE et al., 1989).

#### **2.4.2 Coagulação Sanguínea**

As plaquetas são os componentes primários da coagulação sanguínea, que circulam marginalmente à parede vascular, próximas às células endoteliais. Em condições fisiológicas, as plaquetas não aderem ao endotélio vascular, mas quando ocorre alguma lesão/descontinuidade do endotélio, as plaquetas respondem prontamente. O mecanismo de resposta das plaquetas à lesão endotelial envolve três eventos principais: adesão, ativação e agregação plaquetárias (LEWIS; BAIN; BATES, 2006).

Quando ocorre qualquer alteração da parede vascular, as estruturas do subendotélio ficam expostas, incluindo a membrana basal, o colágeno e as microfibrilas. O fator von Willebrand (FvW) liga-se à glicoproteína Ib/IX (GPIb/IX) da superfície plaquetária, resultando em uma primeira camada de plaquetas aderentes. A ligação FvW-GPIb/IX inicia o mecanismo de ativação plaquetária. As plaquetas ativadas alteram sua forma, expõem fosfatidilserina e outros receptores de membrana, liberam o conteúdo de seus grânulos e promovem o recrutamento de mais plaquetas para o local da lesão (LORENZI, 2006).

Após a primeira camada de adesão, mais plaquetas aderem umas às outras, formando agregados. O fibrinogênio, a fibronectina e os complexos glicoprotéicos GPIb-IX e GPIIb-IIIa são essenciais neste estágio para aumentar o contato entre as plaquetas e facilitar o mecanismo de agregação (LEWIS; BAIN; BATES, 2006).

O processo de coagulação sanguínea, concomitante à ativação plaquetária, foi proposto em 1964 por MacFarlane, em um modelo de cascata, no qual a ativação

de um fator da coagulação implicava na ativação do outro e assim sucessivamente, culminando com a formação do coágulo de fibrina. Este modelo envolvia duas vias distintas, a intrínseca e a extrínseca, iniciadas pelos fatores XII (FXII) e VII (FVII) respectivamente, que convergiam para uma via comum (MACFARLANE, 1964).

Entretanto, ao longo das três últimas décadas, vários estudos foram desenvolvidos propondo alterações na teoria vigente, uma vez que o modelo proposto não explicava porque pacientes com uma das vias intactas também apresentavam sangramentos. Em 2006, Hoffman & Monroe propuseram a nova teoria da coagulação, que foi amplamente aceita pela comunidade científica internacional e publicada pela Sociedade Europeia de Cardiologia. No novo modelo, a coagulação *in vivo* ocorre em etapas reguladas por componentes celulares, iniciadas pelo fator tissular (FT) (HOFFMAN & MONROE, 2007; GÓMEZ & BOVER, 2007). Pela nova perspectiva, a coagulação sanguínea ocorre em três fases:

1 – Fase de iniciação: as células que expressam o fator tissular (FT) são expostas ao sangue no local da lesão vascular. As células endoteliais e monócitos normalmente não expressam o FT, mas podem expressá-lo na ocorrência de lesão endotelial e na presença de estímulos específicos, tais como a liberação de endotoxinas e citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) (HOFFMAN, 2003). O FT liberado age então como receptor para o fator VII da coagulação, ativando-o (FVIIa). O complexo FT–FVIIa ativa diretamente o fator X (FXa) e participa da ativação do fator IX (FIXa) que posteriormente também irá ativar mais fator X. Nesta primeira fase, a ativação do fator X é o ponto decisivo para posterior transformação de protrombina em trombina, porém este processo inicial ainda é insuficiente e forma pequena quantidade de trombina (Figura 5).

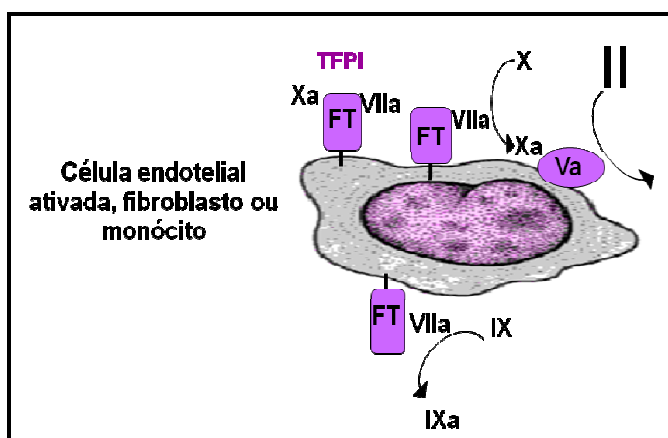


Figura 5 - Iniciação da coagulação, adaptado de Hoffman & Monroe, 2007

2 – Fase de amplificação: A trombina que foi gerada, juntamente com os íons cálcio plasmáticos ( $\text{Ca}^{2+}$ ) e fosfolípides derivados das plaquetas ativam um mecanismo de *feedback* positivo capaz de ativar os fatores V (FVa), XI (FXIa), VIII (FVIIIa) e dissociar o FVIII do FvW. Nesta fase também ocorre ativação de novas plaquetas. Simultaneamente, os fatores ativados, mencionados anteriormente, são atraídos por mecanismos quimiotáticos para a superfície das plaquetas ativadas, produzindo extensão e amplificação do sinal para a cascata da coagulação. Assim, o mecanismo da coagulação sanguínea é efetivamente disparado, amplificando a resposta procoagulante (Figura 6) (HOFFMAN & MONROE, 2007; GÓMEZ & BOVER, 2007).

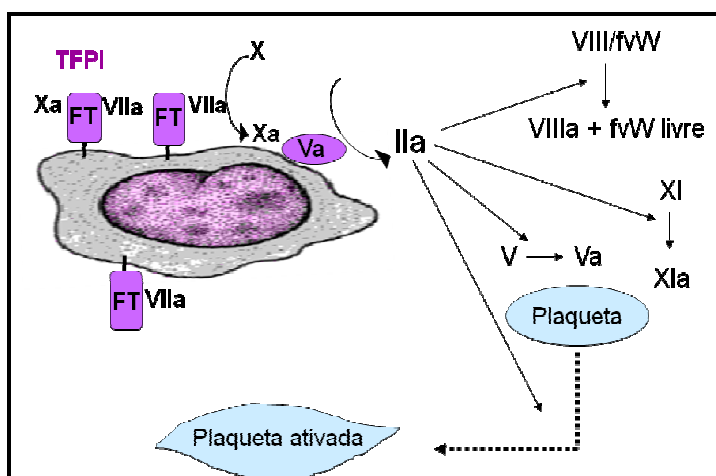


Figura 6 - Amplificação da coagulação, adaptado de Hoffman & Monroe, 2007

3 – Fase de propagação: A amplificação do processo pelo mecanismo de *feedback*, envolvendo a trombina, as plaquetas e a ativação de todos os fatores da coagulação resulta em grande quantidade de complexo protrombinase (FVa,  $\text{Ca}^{2+}$  e FXa), que converte protrombina em trombina. É importante salientar que a atividade do FXa, formado a partir do complexo FT–FVIIa, é restrita às células que expressam FT, pois o FXa que se dissocia da superfície celular é rapidamente inibido pelo TFPI ou pela AT. Por outro lado, o FXa também pode se difundir para a superfície plaquetária adjacente, onde não sofre ação desses inibidores e, desta forma, se ligar ao receptor da superfície plaquetária, interagindo com seu cofator, FVIIIa, ativando mais FX (OLIVER, 1999). A trombina (fator II), formada nesta fase, converte o fibrinogênio (fator I) em fibrina na superfície externa das células endoteliais e sobre as plaquetas.

O coágulo de fibrina formado é sólido e estável e só será dissolvido após ação do sistema fibrinolítico (Figura 7) (HOFFMAN & MONROE, 2007; GÓMEZ & BOVER, 2007).

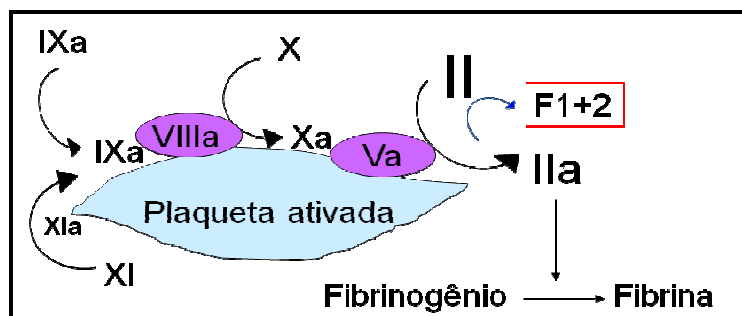


Figura 7 - Propagação da coagulação, adaptado de Hoffman & Monroe, 2007

Embora cada etapa do novo modelo da coagulação sanguínea seja representada de forma isolada, incluindo iniciação, amplificação e propagação, elas devem ser vistas como eventos contínuos e sobrepostos (HOFFMAN & MONROE, 2007).

#### **2.4.2.1 FvW e ADAMTS13**

O fator von Willebrand (FvW) é uma glicoproteína multimérica, sintetizado nas células endoteliais e megacariócitos, essencial para a adesão e agregação plaquetária ao endotélio vascular lesado. Este fator é também o carreador plasmático do fator VIII da coagulação. O FvW é produzido sob a forma de grandes multímeros (gmFvW), que são armazenados dentro dos corpos de Weibel-Palade, nas células endoteliais. Sua estrutura multimérica interage fortemente com as plaquetas e os componentes do endotélio vascular, suportando as condições de fluxo sanguíneo turbulento e a alta pressão de cisalhamento. Os gmFvW não são encontrados normalmente no plasma de indivíduos saudáveis, pois tão logo são liberados das células endoteliais, são clivados em pequenos multímeros pela enzima ADAMTS13, cuja sigla corresponde a “*A Desintegrin And Metalloprotease with eight ThromboSpondin-1-like-member 13*” (PERUTELLI & MOLINARI, 2007; TONACO et al., 2010).

A enzima ADAMTS13 faz parte de uma família com 19 membros, que são caracterizadas por um domínio protease, um domínio desintegrina adjacente e um ou mais domínios trombospondina. Fisiologicamente, esta enzima é responsável pela clivagem e remoção dos gmFvW da circulação. O FvW é o único substrato conhecido dessa enzima. A deficiência quantitativa ou qualitativa de ADAMTS13 resulta no acúmulo de gmFvW no plasma. As plaquetas circulantes aderem-se aos gmFvW e agregam-se, formando trombos microvasculares, que são a gênese da púrpura trombocitopênica trombótica (PTT) (MANEA et al., 2010).

Quando há lesão endotelial, ocorre um aumento expressivo dos níveis plasmáticos de FvW, que contribui para a formação de trombos, pois além de mediar o processo de adesão plaquetária, a elevação de seus níveis previne o clearance de FVIII do plasma, favorecendo a ativação da cascata de coagulação e a geração de trombina. A deficiência de ADAMTS13, bem como a presença de anticorpos contra essa enzima, resulta no aumento plasmático de FvW e também pode ser associada à ocorrência de trombose e a um estado de hipercoagulabilidade (RUGGERI, 2003; RIEGER et al., 2005).

### **2.4.3 Sistema fibrinolítico**

O sistema fibrinolítico faz parte de um processo capaz de degradar o coágulo de fibrina, após a reconstituição da parede vascular que foi lesada (HOFFMAN; MONROE, 2007).

A degradação da fibrina é mediada pela plasmina, principal enzima do sistema fibrinolítico. A plasmina é uma serino protease, produzida a partir de uma pró-enzima inativa, o plasminogênio, por ação de dois ativadores fisiológicos, o ativador de plasminogênio do tipo tecidual (t-PA), que é sintetizado por células endoteliais e representa o principal responsável pela conversão de plasminogênio em plasmina e o ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PA), produzido em vários órgãos, tais como próstata, útero e coração. Além de degradar a fibrina, a plasmina também é capaz de ativar metaloproteinases da matriz extracelular (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004).

Os dois ativadores, t-PA e u-PA, têm alta afinidade e especificidade de ligação com o seu substrato, o plasminogênio. Este, por sua vez, é encontrado em concentrações plasmáticas elevadas, se comparado aos seus ativadores. Portanto,

a formação de plasmina, pelo sistema fibrinolítico, depende da disponibilidade dos dois ativadores de plasminogênio. Embora a plasmina seja capaz de degradar também o fibrinogênio, o fator V (F V) e o fator VIII (F VIII), em condições fisiológicas a fibrinólise ocorre como um processo altamente específico para a remoção do coágulo de fibrina e, portanto, de ativação localizada e restrita (ZAGO; FALCÃO; PASQUINI, 2004; HOFFMAN; MONROE, 2007).

A atividade do sistema fibrinolítico é regulada por inibidores específicos do ativador de plasminogênio (PAI). Existem três tipos de PAI's, mas o inibidor *in vivo* mais importante da fibrinólise é o PAI-1. Além do PAI-1, a  $\alpha$ 2-antiplasmina regula a fibrinólise por inibir diretamente a ação da plasmina (ZORIO et al., 2008).

A degradação da fibrina pela plasmina é essencial para prevenção de coágulos patológicos. A presença de trombina e a oclusão venosa estimulam a liberação de t-PA pelas células endoteliais. O t-PA liberado e o plasminogênio se ligam ao polímero de fibrina. O plasminogênio, por sua vez, é ativado em plasmina, que cliva a fibrina em produtos de degradação solúveis, resultando na dissolução do coágulo (HOFFMAN; MONROE, 2007).

#### **2.4.3.1 Dímero D**

Os dímeros D (D-Di) são fragmentos formados após degradação enzimática da fibrina e permanecem indetectáveis no plasma, até que as ligações cruzadas da molécula dessa proteína sejam rompidas. Primeiramente, a trombina cliva o fibrinogênio, produzindo monômeros de fibrina, que se polimerizam e servem como molde para ativação do fator XIII (FXIIIa) e formação da plasmina. Posteriormente, o FXIIIa cataliza a formação de ligações covalentes entre os domínios D, da molécula de fibrina e a plasmina degrada a fibrina reticulada para liberar os produtos de degradação da fibrina e expor os antígenos D-Di (ADAM; KEY; GREENBERG, 2009).

O D-Di é um marcador exclusivo de degradação da fibrina e reflete a gravidade de um estado de hipercoagulabilidade. Sua determinação tem importância no diagnóstico e no monitoramento de doenças tromboembólicas. A principal aplicação clínica para a determinação de D-Di é na exclusão do tromboembolismo venoso (TEV) e está bem estabelecido seu valor preditivo negativo. Além desta utilização, os D-Di têm sido cada vez mais estudados como marcadores da ativação

da coagulação em várias outras situações clínicas, tais como a trombose arterial, a doença arterial coronariana e a aterosclerose renal (ADAM; KEY; GREENBERG, 2009).

#### **2.4.4 Alterações hemostáticas e o processo de rejeição**

O equilíbrio entre o endotélio vascular intacto e o mecanismo hemostático visa manter o sangue fluido no interior dos vasos. Quando ocorre perda da integridade vascular, o sangue que circula sob pressão escapa dos vasos. O mecanismo hemostático é então ativado rapidamente de modo a cessar o sangramento. No entanto, a ativação exagerada do mecanismo hemostático pode resultar em coagulação sanguínea excessiva e formação de trombos na luz dos vasos (LEE et al., 2007; WOOTLA et al., 2008).

O papel dos marcadores hemostáticos no transplante renal ainda não está totalmente esclarecido. A ativação da coagulação sanguínea, a supressão do sistema fibrinolítico, o progresso da aterosclerose e o desenvolvimento da hipertensão arterial têm sido observados em pacientes transplantados renais. No entanto, o mecanismo de ativação da coagulação e/ou de redução da fibrinólise ainda não é totalmente conhecido nesses pacientes. A determinação laboratorial de marcadores do sistema hemostático tem sido utilizada como forma de inferir as alterações que ocorrem em pacientes transplantados renais (HRYSZKO et al., 2001; MALYSZKO et al., 2006a).

Fatores de risco ambientais, genéticos e adquiridos são capazes de predispor o organismo à hipercoagulabilidade e, dentre os fatores de risco adquiridos, destaca-se o mecanismo da rejeição ao rim transplantado. Este processo é capaz de ativar a coagulação intra-renal, resultando em aterosclerose dos vasos e levar, conseqüentemente, à perda do rim. A ativação da resposta inflamatória observada no tecido renal de pacientes transplantados é capaz de explicar a ativação concomitante da coagulação nesses pacientes (LEE et al., 2007; WOOTLA et al., 2008). Em todos os tipos de rejeição renal tem sido observada uma persistente deposição de fibrina em pequenos e grandes vasos e nos tecidos vizinhos. No entanto, os mecanismos que desencadeiam a deposição de fibrina e a sua relevância patológica ainda não estão totalmente esclarecidos. A fibrina em excesso

pode resultar tanto da ativação exagerada da coagulação como da inibição do sistema fibrinolítico (LEE et al., 2007).

Os dados sobre marcadores da coagulação determinados pré e pós-transplante ainda são limitados. No estudo de Levitsky et al. 2009, foi relatado que a média de ativação da PC pode chegar à 123%, aproximadamente, em pacientes com DRC submetidos à hemodiálise. Também neste estudo, foi detectado que a elevação de D-Di é utilizada, muitas vezes, para avaliar a coagulação e a fibrinólise em pacientes transplantados renais e sabe-se que este permanece elevado no pós-transplante imediato.

Um aumento significativo da concentração plasmática de D-Di também foi relatado em outro estudo recente, que avaliou este marcador 7 e 14 dias após a realização do transplante. Este achado indica uma intensificação do processo de coagulação em pacientes transplantados renais, o que sugere um aumento do risco de trombose, mesmo com a utilização da terapia antitrombótica. É importante salientar que a inserção da profilaxia antitrombótica no período pré-operatório aumenta o risco de complicações hemorrágicas e, portanto, deve ser utilizada com cautela (PAWLICKI et al., 2011).

Um estudo recente encontrou que à medida que a função renal deteriora, a lesão ao endotélio aumenta e isso pode ser refletido pelo aumento das concentrações plasmáticas de FvW, TM e citocinas (ZBROCH et al., 2012).

Um estado de hipercoagulabilidade, anormalidades do sistema fibrinolítico, disfunção e lesão endoteliais têm sido observados em pacientes transplantados renais e podem ser associados à disfunção crônica do enxerto. O acidente vascular encefálico, o infarto agudo do miocárdio e outros acometimentos vasculares, que estão associados à hipercoagulabilidade e/ou à hipofibrinólise, constituem causas importantes de mortalidade em pacientes transplantados renais ou resultam na perda do enxerto ao longo dos anos (BARRETO et al., 2010).

## **2.5 Terapia imunossupressora**

Os avanços da cirurgia de transplante, a seleção do doador e do receptor, a identificação de painéis de anticorpos reativos, a compatibilidade HLA e a correspondência entre os tecidos transplantados têm resultado em maior êxito do transplante renal e maior sobrevivência do enxerto. Entretanto, a sobrevivência do rim

transplantado a longo prazo depende de muitos outros fatores, dentre eles a gravidade dos episódios de rejeição e o sucesso da terapia imunossupressora (LIPTAK; IVANYI, 2006).

O grande desafio para as equipes médicas de transplante, após o sucesso da cirurgia, é adequar para cada paciente um nível ideal de imunossupressão, capaz de prevenir a rejeição aguda e crônica, sem riscos de infecções e efeitos adversos das drogas. Os esforços das pesquisas em todo o mundo se concentram no desenvolvimento de tolerância imunológica de órgãos transplantados. Neste sentido, duas questões, a serem respondidas, são importantes: como induzir a tolerância e como testar se a indução está funcionando? (NEIPP; JACKOBS; KLEMPNAUER, 2009).

Vários protocolos de imunossupressão têm sido testados nas diferentes unidades de transplantes, no Brasil e no mundo. Os agentes imunossupressores são utilizados para indução de tolerância, imunossupressão intensa nos primeiros dias e meses após o transplante, manutenção do órgão transplantado e reversão dos episódios de rejeição já estabelecidos (COOPER & WISEMAN, 2010).

Os corticosteroides foram os primeiros imunossupressores utilizados na prática clínica, sendo a prednisona e a metilprednisolona os mais empregados. Os corticoides são drogas antiinflamatórias potentes, capazes de promover o bloqueio da expressão dos genes de diversas citocinas (BARROS et al., 2006). Os glicocorticoides exercem seus efeitos de maneira direta e indireta sobre seus receptores específicos intracitoplasmáticos. No primeiro caso, o complexo esteroide-receptor inibe a expressão de várias citocinas responsáveis pela imunidade mediada por linfócitos T, como a IL-1, IL-2, IL-6, TNF- e IFN-. No segundo caso, ocorre estimulação para a transcrição de moléculas reguladoras do processo inflamatório, como a IL-4 e IL-5 (HALLORAN, 2004; BENNETT, 2006; SALOMÃO, 2007).

A introdução da ciclosporina na terapia imunossupressora, a partir da década de 80, resultou em uma taxa de sobrevida no primeiro ano pós-transplante de cerca de 90%. No entanto, a sobrevida do rim a longo prazo (5 a 10 anos) ainda situa-se abaixo do esperado e o maior responsável pela perda do órgão é o desenvolvimento da disfunção tardia do enxerto (MASRI, 2003). Os agentes imunossupressores inibidores da calcineurina constituem a terapia mais utilizada na prevenção da rejeição em transplantes renais e são representados pela ciclosporina e tacrolimus. O mecanismo de ação dessas drogas está associado à prevenção da ativação de

células T, pela inibição da calcineurina. A calcineurina é uma proteína sinalizadora que forma junto com o cálcio intracelular uma via de ativação para várias moléculas, por exemplo, a IL-2. A ciclosporina e o tacrolimus formam complexos heterodímeros com um receptor protéico intracitoplasmático, sendo que a ciclosporina liga-se à ciclofilina e o tacrolimus ao FKBP12. Os complexos formados ligam-se à calcineurina, bloqueando sua atividade de desfosforilação do NF-AT (fator nuclear ativador de células T). Nas doses terapêuticas habituais, o tacrolimus parece ser mais eficiente em reduzir a incidência de rejeição aguda que a ciclosporina, porém ambas as drogas ainda são empregadas na profilaxia da rejeição ao enxerto (SEMENTILLI et al., 2008)

O arsenal terapêutico imunossupressor inclui outras diversas substâncias, dentre elas a azatioprina, o micofenolato mofetil (MMF) e sódico (MFS), as rapamicinas (sirolimus e everolimus), o FTY720 e os anticorpos policlonais e monoclonais (COOPER & WISEMAN, 2010).

A azatioprina é uma droga antimetabólica, análoga das purinas, que funciona como antagonista das mesmas. Seu mecanismo de ação se baseia na inibição da síntese de DNA, inibição da proliferação celular e ativação da apoptose. No entanto, este imunossupressor possui efeito tóxico em todos os órgãos, justamente por interferir na síntese de DNA. Seus principais efeitos colaterais são leucopenia, depressão da medula óssea e toxicidade hepática (BARROS et al., 2006; SALOMÃO, 2007).

O micofenolato (mofetil e sódico) é uma pró-droga do MPA (ácido micofenólico), que por sua vez é um inibidor da síntese de purinas. O MPA inibe a proliferação de linfócitos T e B, diminui a geração de células T citotóxicas e inibe a produção de anticorpos. Em diversos estudos clínicos foi demonstrado que a associação do micofenolato com a ciclosporina se mostrou superior à azatioprina na prevenção da rejeição em transplantes renais. Adicionalmente, o micofenolato possui efeito inibitório sobre a proliferação de células musculares lisas, o que sugere uma possível aplicação desses fármacos na profilaxia ou no tratamento da rejeição crônica. Seus principais efeitos tóxicos, não-imunes, consistem em diarreia, anemia e leucopenia (HALLORAN, 2004; BENNETT, 2006; SALOMÃO, 2007).

O sirolimus e o everolimus são inibidores da proteína-alvo da rapamicina (TOR), mas não inibem a calcineurina. Estas drogas atuam em vias de sinalização que impedem a ativação do ciclo celular, por meio dos receptores de citocinas. O sirolimus é capaz de inibir a proliferação de diversas células, estimuladas por

citocinas, por exemplo as células musculares lisas. No entanto, esta droga parece não ser eficaz no bloqueio da proliferação de linfócitos T, que têm maior dependência da via da calcineurina. Seus principais efeitos indesejáveis incluem a trombocitopenia e a hiperlipidemia (SALOMÃO, 2007; CONTRERAS et al., 2008; HALL, 2008).

O FTY720 é um imunossupressor que atua como agonista de alta afinidade pelo receptor esfingosina-1-fosfato. Seu mecanismo de ação está relacionado ao desenvolvimento de linfopenia, que pode ser decorrente de migração linfocitária para os órgãos linfóides e/ou de indução da apoptose. Ao contrário dos demais imunossupressores, o FTY720 parece não prejudicar as funções de proliferação e ativação das células T e B e poderia ser utilizado em associação com os inibidores de calcineurina. Entretanto, um estudo recente não encontrou uma vantagem significativa na associação de FTY720 com tacrolimus e glicocorticoides sobre o tratamento associado ao micofenolato na prevenção da rejeição em pacientes transplantados renais (HOITSMA et al., 2011). De qualquer forma, acredita-se que este seja um imunossupressor com grande probabilidade de aplicação clínica nos próximos anos. Em setembro de 2010, o FTY720 foi aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) como tratamento de primeira escolha para a esclerose múltipla, nos Estados Unidos (BARROS et al., 2006; BRINKMANN et al., 2010).

A utilização das drogas imunossupressoras melhora substancialmente os resultados dos transplantes renais e a sobrevida do órgão a curto e longo prazos, entretanto, essas drogas possuem efeitos colaterais importantes, que variam de paciente para paciente, de acordo com as substâncias e doses administradas. Cumpre destacar que algumas destas drogas possuem efeitos nefrotóxicos, que podem comprometer o enxerto renal, levando à sua disfunção, bem como à hipertensão e à hiperlipidemia (SEMENTILLI et al., 2008).

As manifestações de nefrotoxicidade podem ser agudas ou crônicas, funcionais ou estruturais. A realização da biópsia é um procedimento relativamente seguro e constitui o padrão de eleição para o diagnóstico da disfunção do enxerto aguda ou crônica, imunológica ou não imunológica, incluindo as infecções virais que podem acometer o órgão. Entretanto, as coletas para a biópsia têm sido questionadas, por constituírem procedimentos invasivos, potencialmente associados a riscos, além das questões que envolvem a padronização dos laudos histopatológicos (SEMENTILLI et al., 2008).

Desta forma, o sucesso da terapia imunossupressora depende, em parte, do uso racional destes medicamentos e dos avanços nos estudos que propiciam um melhor entendimento da resposta imunológica e hemostática nos pacientes transplantados renais.

### *3 OBJETIVOS*

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Investigar biomarcadores inflamatórios e hemostáticos em pacientes submetidos ao transplante de rim, sem sinais clínicos de rejeição, distribuídos em subgrupos de acordo com a função renal e o tempo pós-transplante.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Avaliar os níveis plasmáticos das citocinas IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 em pacientes transplantados renais distribuídos em subgrupos de acordo com a função renal e o tempo pós-transplante;

3.2.2 Avaliar os níveis plasmáticos dos marcadores hemostáticos trombomodulina (TM), fator von Willebrand (FvW), ADAMTS13 e dímero D (D-Di) em pacientes transplantados renais distribuídos em subgrupos de acordo com a função renal e o tempo pós-transplante;

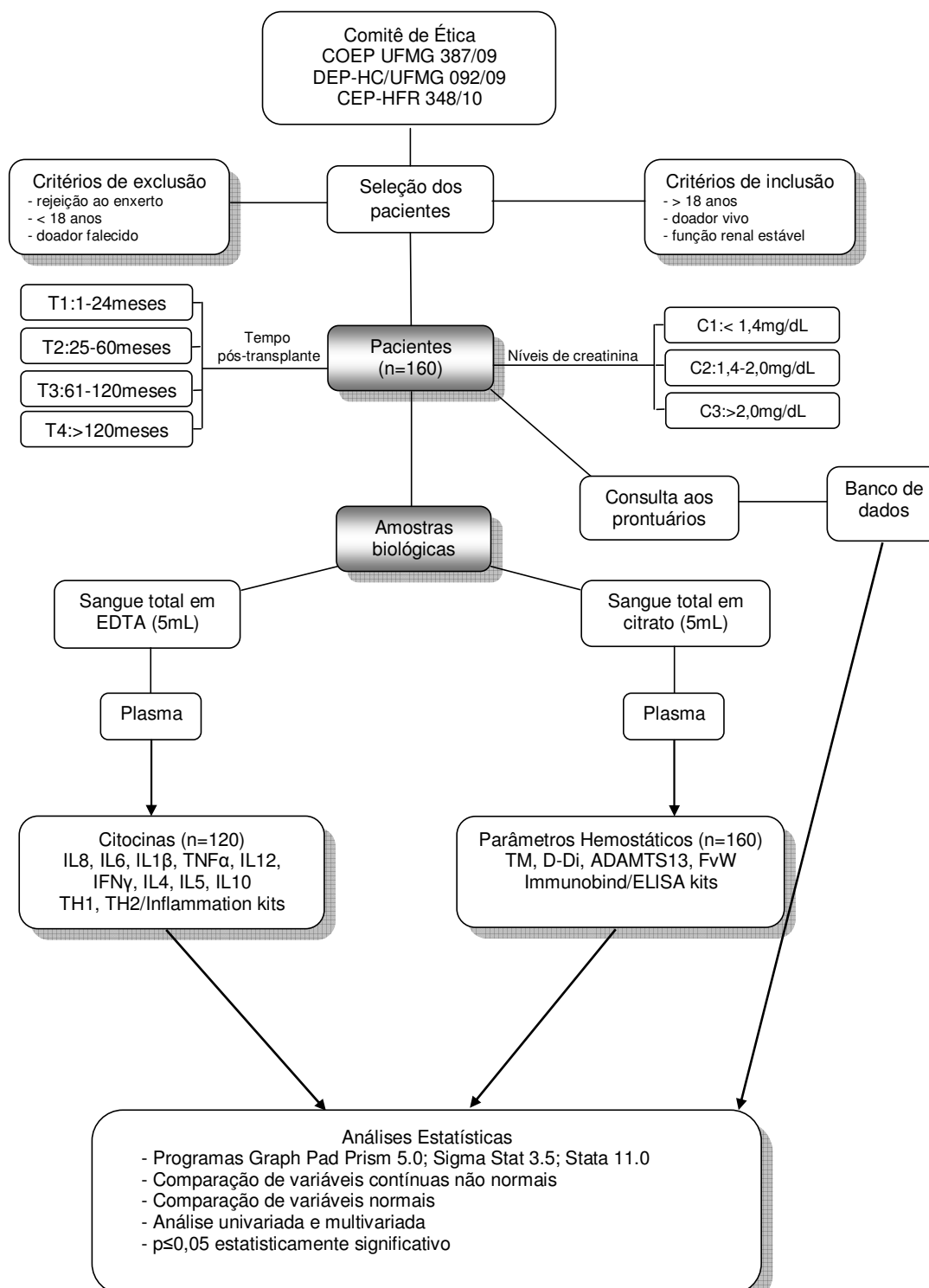
3.2.3 Investigar a associação dos parâmetros clínicos, marcadores inflamatórios e hemostáticos com os níveis plasmáticos de creatinina;

3.2.4 Investigar a associação dos parâmetros clínicos, marcadores inflamatórios e hemostáticos com o ritmo de filtração glomerular (eRFG).

## *4 MATERIAL E MÉTODOS*

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento experimental



O presente trabalho, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e a ficha clínica para seleção dos pacientes foram aprovados sob o ponto de vista ético e formal pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 387/09), pela Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão (DEPE) do Hospital das Clínicas da UFMG (Processo 092/09) e pelo Comitê de Ética em Pesquisas do Hospital Felício Rocho (CEP-HFR) (Processo 348/10), conforme anexos A, B e C.

O esclarecimento dos objetivos da pesquisa, utilizando-se linguagem clara e destacando-se a participação voluntária foi feito pela pesquisadora aos pacientes envolvidos no estudo, durante o período de coleta das amostras. A assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo D) foi obtida no momento da coleta de sangue.

A ficha clínica (Anexo E) individual e padronizada, contendo dados clínicos e laboratoriais relevantes para a análise dos resultados, foi preenchida para todos os pacientes a partir dos prontuários médicos e de enfermagem.

Para determinação do número de pacientes participantes (n) foi realizado o cálculo amostral, a partir dos resultados parciais obtidos para o dímero-D, interferon gama e interleucina-5. As análises foram realizadas utilizando-se o teste ANOVA e o programa GPOWER (versão 3.1), admitindo-se um poder amostral maior que 90%. Os resultados obtidos para os parâmetros citados definiram o n=160 para este estudo.

## **4.2 Casuística**

Os 160 pacientes transplantados renais foram selecionados durante a rotina de atendimento no Ambulatório de Transplantes da Unidade Bias Fortes, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e na Unidade de Transplantes do Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, Minas Gerais, nos anos de 2010 e 2011. A realização deste protocolo de pesquisa não interferiu em nenhuma conduta ou prescrição médica.

Foram coletadas amostras biológicas de sangue venoso no período da manhã, sem exigência de jejum. A população de estudo compreendeu 103 homens e 57 mulheres com idade entre 19 e 73 anos e tempo pós-transplante entre 1 e 229 meses.

Todos os pacientes participantes receberam o rim de doadores vivos e foram selecionados de forma sequencial ao atendimento, nos ambulatórios dos serviços de transplantes citados, no dia da coleta das amostras para os exames de monitoração pós-transplante. Os dados clínicos relativos às dosagens de creatinina e à data de realização do transplante renal foram coletados dos prontuários de cada paciente participante para posterior categorização em subgrupos.

Os pacientes foram inicialmente distribuídos em três subgrupos de acordo com níveis plasmáticos de creatinina (HUMAR et al., 2002; LING et al., 2007; JUNG, LEE, KWON, 2012), sendo:

- C1: Creatinina inferior a 1,4mg/dL (n=74)
- C2: Creatinina entre 1,4 e 2,0mg/dL (n=60)
- C3: Creatinina superior a 2,0mg/dL (n=26)

Os pacientes transplantados renais também foram distribuídos em quatro subgrupos de acordo com o tempo pós-transplante, sendo:

- T1: 1 a 24 meses (n=41);
- T2: 25 a 60 meses (n=40);
- T3: 61 a 120 meses (n=40);
- T4: acima 120 meses pós-transplante (n=39)

#### **4.2.1 Critérios de inclusão**

- Pacientes transplantados renais que receberam o rim de doadores vivos;
- Idade superior a 18 anos;
- Pacientes com função renal estável estabelecida clinicamente (enxerto funcionante). A confirmação da estabilidade clínica dos pacientes transplantados foi feita pelos nefrologistas colaboradores deste estudo e por meio da consulta aos dados clínicos e laboratoriais disponíveis nos prontuários.

#### **4.2.2 Critérios de exclusão**

- Pacientes transplantados renais que receberam o rim de doadores falecidos;

- Idade inferior a 18 anos e/ou pacientes pediátricos;
- Pacientes que apresentavam suspeita clínica de rejeição ou rejeição ativa no momento da coleta de sangue;
- Pacientes que fizeram cirurgias recentes;
- Pacientes que tiveram fraturas recentes;
- Pacientes que estavam sob tratamento hemodialítico no momento da abordagem ou que foram indicados para retorno à hemodiálise no dia da coleta de sangue;
- Pacientes que tiveram suspeita clínica de rejeição declarada pelo médico nefrologista no dia da coleta ou que foram encaminhados à nova realização do exame de “painel”, por suspeita de rejeição;
- Pacientes que não utilizavam corticóides em sua terapia imunossupressora, com o objetivo de padronizar parcialmente os esquemas imunossupressores;
- Pacientes que apresentavam resultados de clearance de creatinina recente inferior a  $60\text{mL}/\text{min}/1,73\text{m}^2$ ;
- Pacientes que apresentavam resultados recentes de biópsia renal indicativos de rejeição aguda ou crônica;
- Pacientes que apresentavam infecções virais ativas, tais como CMV ou que estivessem em terapia anti-viral profilática por suspeita de infecções.

### **4.3 Amostras biológicas**

Para obtenção das amostras de plasma foram coletados 10mL de sangue total, sendo 5mL em citrato de sódio 0,109 mol/L e 5mL em EDTA-K3 1,8mg/mL, em tubos VACUETTE® para coleta à vácuo. As amostras foram coletadas no período da manhã, sem exigência de jejum, no ambulatório de transplantes da Unidade Bias Fortes, do Hospital das Clínicas da UFMG e no Instituto Hermes Pardini, unidade do Hospital Felício Rocho, ambos em Belo Horizonte, Minas Gerais.

#### **4.3.1 Preparo e conservação das amostras biológicas**

Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixas térmicas e transportadas sob refrigeração, imediatamente após término das coletas, até o laboratório para centrifugação, separação do plasma e congelamento a -80°C.

As amostras foram centrifugadas a 2.500 rpm, durante 20 minutos, em centrífuga Jouan® modelo BR4i, entre 2 e 8°C, para obtenção das amostras de plasma.

As alíquotas de plasma (cerca de 1mL) foram transferidas para micro tubos plásticos, com tampa de rosca e anel de borracha protetor, da marca Axygen® e armazenadas em freezer vertical -80°C Jouan® modelo VX380, até o momento do uso. Todos os testes foram realizados com amostras descongeladas uma única vez.

### **4.4 Preparo do banco de dados**

As fichas clínicas dos pacientes foram parcialmente preenchidas no ato da coleta de sangue, com os dados pessoais dos pacientes por auto-relato e, posteriormente, os prontuários foram consultados para a obtenção de dados da evolução clínica, desde a data do transplante renal até o momento da coleta de sangue. Os parâmetros coletados foram utilizados para elaboração de um banco de dados, com informações relativas à idade, sexo, tempo de hemodiálise, doença primária, complicações/comorbidades pós-transplante e outras doenças associadas, terapia imunossupressora e demais medicamentos em uso, marcadores de função renal e hepática, hemograma, grupo sanguíneo, compatibilidade HLA, prova cruzada e PRA.

## 4.5 Métodos

### 4.5.1 Determinação plasmática de citocinas por citometria de fluxo (CBA – Cytometric Beads Array)

O sistema BD™ CBA utiliza como princípio o imunoenensaio de partículas (esferas ou beads). Cada esfera possibilita a captura seletiva de uma proteína específica em sua superfície. O kit BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine (BD® Biosciences Pharmingen, USA) consiste em uma suspensão de esferas que permitem a detecção de múltiplos analitos em uma única amostra de pequeno volume. O kit pode ser usado para determinar quantitativamente interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). As populações de esferas são revestidas com anticorpos de captura específicos para essas citocinas, com distintas intensidades de fluorescência. A incubação com um conjugado marcado leva à formação de um complexo-sanduíche. Os limites de detecção estabelecidos pelo fabricante do kit são IL-2 (2,6 pg/mL), IL-4 (2,6 pg/mL), IL-5 (2,4 pg/mL), IL-10 (2,8 pg/mL), TNF- $\alpha$  (2,8 pg/mL) e IFN- $\gamma$  (7,1 pg/mL). As leituras dos testes foram realizadas em citômetro de fluxo BD™FACScalibur do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Osvaldo Cruz. Após aquisição dos dados da amostra, os resultados foram gerados em formato gráfico e tabular. O fabricante do kit diagnóstico não fornece valores de referência para as citocinas avaliadas. O kit BD™ CBA Human Th1/Th2 Cytokine foi utilizado apenas para as determinações de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5.

Para quantificação das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$  e IL-12p70 foi utilizado o kit Human Inflammation (BD® Biosciences Pharmingen, USA), que utiliza o mesmo princípio descrito anteriormente, entretanto as populações de esferas são revestidas com anticorpos de captura específicos para essas citocinas, com intensidades de fluorescência distintas. Os limites de detecção estabelecidos pelo fabricante do kit são IL-1 $\beta$  (7,2pg/mL), IL-6 (2,5pg/mL), IL-8 (3,6pg/mL), IL-10 (3,3pg/mL), TNF- $\alpha$  (3,7pg/mL) e IL-12p70 (1,9pg/mL).

#### **4.5.2 Determinação plasmática do parâmetro hemostático Trombomodulina (TM)**

O princípio do teste consiste na captura dos antígenos trombomodulina (TM) por anticorpos monoclonais (anti-TM), fixados na superfície de uma placa, que reconhecem os domínios EGF1 e EGF2 da molécula. Os antígenos não capturados são retirados por lavagens sucessivas. Em seguida adicionam-se os segundos anticorpos monoclonais (conjugados com peroxidase), que vão se ligar aos domínios EGF5 e EGF6 da molécula de TM, completando o sistema anticorpo-antígeno-anticorpo (sanduíche). Os anticorpos conjugados com peroxidase que não se ligaram à TM são, posteriormente, retirados por lavagens sucessivas. A revelação dos antígenos capturados na primeira etapa é feita pela reação da enzima peroxidase (HRP), ligada ao segundo anticorpo, com o substrato TMB (3, 3', 3, 5' - tetrametilbenzidina), gerando um produto de coloração azul. Essa reação é interrompida pela adição de ácido sulfúrico e a cor torna-se amarela. A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de TM na amostra plasmática. Os testes para determinação dos níveis plasmáticos de TM foram realizados utilizando-se o conjunto diagnóstico IMUNOBIND® Thrombomodulin ELISA (American Diagnostica® Inc.). A leitura da placa foi feita utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES (USA). O intervalo de referência do teste, fornecido pelo fabricante do kit diagnóstico, é de 4,00 a 5,35ng/mL. O limite mínimo de detecção do teste é de 0,3ng/mL.

#### **4.5.3 Determinação plasmática do parâmetro hemostático Fator de von Willebrand (FvW)**

O princípio do teste é o mesmo descrito para TM, no entanto, os anticorpos fixados na placa são específicos para os antígenos FvW do plasma (anti-FvW). A determinação do FvW foi realizada utilizando-se o Kit IMUNOBIND® FvW (American Diagnostica® Inc.), seguindo-se rigorosamente as instruções do fabricante. A leitura da placa foi feita utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES (USA). O fabricante do kit diagnóstico não fornece faixa de referência e limite mínimo de detecção para esse marcador. Para comparações com

os resultados obtidos utilizamos o valor médio de diversas determinações realizadas em plasmas de voluntários saudáveis [805 mU/mL (683-1012mU/mL)], obtidos no Laboratório de Hematologia Clínica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais.

#### **4.5.4 Determinação plasmática do parâmetro hemostático ADAMTS13**

O princípio do teste é o mesmo descrito para TM e FvW, no entanto os anticorpos fixados na superfície da placa são específicos para antígenos ADAMTS13 do plasma (anti-ADAMTS13). Os testes para ADAMTS13 foram realizados utilizando-se o conjunto diagnóstico IMUNOBIND® ADAMTS13 ELISA (American Diagnostica® Inc.). A leitura da placa foi feita utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES (USA). O intervalo de referência para o teste, fornecido pelo fabricante do kit diagnóstico, é de 630 a 860ng/mL. O fabricante do kit diagnóstico não fornece limite mínimo de detecção para esse marcador.

#### **4.5.5 Determinação plasmática do parâmetro hemostático dímero-D (D-Di)**

O princípio do teste é o mesmo descrito para TM, FvW e ADAMTS13, no entanto os anticorpos fixados na superfície da placa são específicos para dímero-D (anti-DDi). A intensidade da cor produzida (determinada fotometricamente) é diretamente proporcional à concentração de D-Di na amostra plasmática. A determinação dos níveis plasmáticos de D-Di foi realizada utilizando-se o conjunto diagnóstico Imunoclone® D-dimer Elisa Kit (American Diagnostica® Inc.). A faixa de referência para o teste, fornecida pelo fabricante, é inferior a 400ng/mL. O limite mínimo de detecção do teste, fornecido pelo fabricante, é de 2 a 4ng/mL

As leituras das placas de ELISA dos parâmetros hemostáticos foram feitas utilizando-se o leitor de microplacas VersaMax Microplate Reader - MOLECULAR DEVICES (USA), na Faculdade de Farmácia da UFMG. Em todos os testes foram obtidas as curvas de calibração e foram utilizadas amostras controle de concentração conhecida. Algumas amostras biológicas foram testadas em duplicata para avaliar reprodutibilidade das técnicas e os resultados obtidos foram praticamente coincidentes.

#### **4.5.6 Análise dos prontuários e elaboração do banco de dados**

Os resultados dos exames de rotina, solicitados ao Laboratório do Hospital das Clínicas da UFMG e ao Laboratório Hermes Pardini no Hospital Felício Rocho, tais como hemograma, dosagens de imunossuppressores, marcadores de função renal e hepática e outros foram consultados nos prontuários de atendimento médico e de enfermagem e foram utilizados para avaliar os diferentes subgrupos de pacientes, por meio de correlações com os marcadores inflamatórios e hemostáticos utilizados neste trabalho.

#### **4.5.7 Análise dos dados**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se os programas GraphPad PRISM (versão 5.0), SigmaStat (versão 3.5) e STATA (versão 11.0). A normalidade dos dados foi testada pelo método de Kolmogorov-Smirnov. A comparação entre os grupos foi feita utilizando-se o teste “t” de Student para as variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal e o método não paramétrico de *Mann-Whitney* para as variáveis com distribuição não normal. O teste de *Kruskal-Wallis*, seguido de teste de Dunn foi utilizado para identificação da diferença entre as medianas entre mais de dois grupos. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste de qui-quadrado ( $\chi^2$ ) ou teste exato de Fisher. A associação entre a função renal e as variáveis independentes foi investigada por meio de regressão logística univariada e multinomial. Como as variáveis podem atuar como fator de confusão, foi feita uma análise multivariada por bloco, com todas aquelas variáveis ao nível de significância de  $p \leq 0,20$  na análise univariada. Foram consideradas diferenças significativas valores de  $p \leq 0,05$ .

## *5 RESULTADOS*

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Características clínicas da população estudada

O presente estudo incluiu 160 pacientes transplantados renais, que possuíam 1 a 229 meses pós-transplante e função renal estável. Os dados clínicos dos integrantes do estudo estão apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1- Características clínicas dos integrantes do estudo**

Parâmetros	Masculino (n=103)	Feminino (n=57)	Total (n=160)	p
Idade (anos)	44 (21-71)	37 (19-73)	42 (19-73)	0,090
IMC (Kg/m <sup>2</sup> )	25,0 (23,6-27,4)	24,1 (22,9-26,1)	24,8 (17,6-41,2)	0,128
Causa primária da DRC [n(%)]				
Nefroesclerose hipertensiva	24 (23,3%)	14 (24,5%)	38(23,8%)	
Glomerulopatias	10 (9,7%)	7 (12,4%)	17 (10,6%)	
Nefropatia diabética*	14 (13,6%)	4 (7,0%)	18 (11,3%)	0,027
Outras causas	5 (4,9%)	4 (7,0%)	9 (5,6%)	
Etiologias desconhecidas	22 (21,4%)	11 (19,3%)	33 (20,6%)	
Não informado	28 (27,2%)	17 (29,8%)	45 (28,1%)	
Tempo de HD (meses)*	20 (12-30)	12 (8-20)	15 (12-30)	<0,001
PRA pré-transplante				
Negativo	30 (29,1%)	34 (59,6%)	64 (40,0%)	
Positivo	11 (10,7%)	2 (3,6%)	13 (8,1%)	0,730
Não realizado	7 (6,8%)	3 (5,3%)	10 (6,3%)	
Não informado	55 (53,4%)	18 (31,6%)	73 (45,6%)	
Terapia imunossupressora				0,921
Tacr+MMF+Pred	56 (54,4%)	30 (52,6%)	86 (53,8%)	
CSA+MMF+Pred	31 (30,1%)	18 (31,6%)	49 (30,6%)	
Rapa+MMF+Pred	5 (4,9%)	3 (5,3%)	8 (5,0%)	
Outras	11 (10,6%)	6 (10,5%)	17 (10,6%)	
Outros medicamentos				
Hipotensores				0,232
IECA	25 (24,3%)	8 (14,0%)	33 (20,6%)	
β-bloqueadores	17 (16,5%)	7 (12,3%)	24 (15,0%)	
Antagonistas de canal de cálcio	6 (5,8%)	3 (5,3%)	9 (5,6%)	
ARA	4 (3,9%)	4 (7,0%)	8 (5,0%)	
Diuréticos	9 (8,7%)	7 (12,3%)	16 (10,0%)	
Ácido Acetilsalicílico	14 (13,6%)	5 (8,8%)	19 (11,9%)	ND
Estatinas/Fibratos	21 (20,4%)	9 (15,8%)	30 (18,8%)	ND
Suplementos/Polivitamínicos	13 (12,6%)	10 (17,5%)	23 (14,4%)	ND
Ansiolíticos/Antidepressivos	11 (10,7%)	11 (19,3%)	22 (13,8%)	ND
Insulina/Hipoglicemiantes orais	5 (4,9%)	3 (5,3%)	8 (5,0%)	ND
Outros	41 (39,8%)	17 (29,8%)	58 (36,3%)	ND

*continua*

Comorbidades pós-transplante				0,819
ITU de repetição	6 (5,8%)	5 (8,8%)	11 (6,9%)	
DM	2 (1,9%)	2 (3,5%)	4 (2,5%)	
HAS	4 (3,9%)	2 (3,5%)	6 (3,8%)	
CMV	3 (2,9%)	0 (0,0%)	3 (1,9%)	
Outras	22 (21,4%)	13 (22,8%)	35 (21,8%)	
Não apresentaram/ não relatado	66 (64,1%)	35 (61,4%)	101 (63,1%)	

\* $p \leq 0,05$ =significativo. Os dados não-paramétricos estão apresentados como mediana e intervalo interquartil (Mann-Whitney Rank Sum Test/Kruskal-Wallis). Dados de frequência (%) foram analisados pelo teste  $\chi^2$  ou pelo teste exato de Fisher. IMC: índice de massa corporal. DRC: doença renal crônica. HD: hemodiálise. PRA: reatividade contra painel de linfócitos. Tacr: tacrolimus. MMF: micofenolatomofetil. Pred: prednisona. CSA: ciclosporina. Rapa: rapamicinas (Sirolimus ou Everolimus). IECA: inibidores da enzima conversora de angiotensina. ARA: antagonistas dos receptores de angiotensina. ITU: infecção do trato urinário. DM: diabetes mellitus. HAS: hipertensão arterial sistêmica. CMV: citomegalovírus. ND: não determinado.

A maioria dos pacientes transplantados renais incluídos no estudo era do sexo masculino (64,4%). A mediana das idades para o sexo masculino e feminino não mostrou diferença e foi 44 e 37 anos, respectivamente ( $p=0,090$ ). As medianas obtidas para o IMC, dos homens (25,0) e das mulheres (24,1), também não mostraram diferenças ( $p=0,128$ ) e revelaram que a maioria dos pacientes estava na faixa de peso eutrófico (IMC entre 18,6 e 24,9 Kg/m<sup>2</sup>). Em relação às doenças primárias que levaram à DRC, na maioria dos casos, a verdadeira causa da doença renal não era conhecida ou não foi informada (48,8%). A nefrosclerose hipertensiva foi a causa mais comum associada à DRC, tanto em homens (23,3%), quanto em mulheres (24,5%). As glomerulopatias crônicas foram mais frequentes em mulheres (12,4%), enquanto que a nefropatia diabética foi significativamente mais frequente em homens (13,6%) que em mulheres (7,0%), como mostra a tabela 1.

O tempo médio de hemodiálise foi significativamente maior nos pacientes do sexo masculino (20 meses) que nas pacientes do sexo feminino (12 meses) com  $p < 0,001$ . Em relação à reatividade contra painel de linfócitos (PRA), realizado pré-transplante, 40,0% dos pacientes apresentaram PRA negativo, 8,1% positivos, 6,3% não realizaram o exame pré-transplante e 45,6% não possuíam o dado disponível no prontuário.

A terapia imunossupressora tripla foi a mais utilizada pelos pacientes do estudo, sendo principalmente composta por Tacrolimus + Micofenolatomofetil + Prednisona (53,8%). Dentre os medicamentos utilizados, além da terapia imunossupressora, os hipotensores foram os mais comuns, sendo que 61 homens (59,2%) e 29 mulheres (50,9%) utilizavam algum tipo de hipotensor. A comparação estatística da frequência de uso dos demais medicamentos entre homens e

mulheres não foi determinada devido à dificuldade de categorização dos pacientes, uma vez que esses utilizavam terapia múltipla.

Em relação à presença de comorbidades e/ou complicações detectadas após a realização do transplante renal, a maioria dos pacientes do estudo (63,1%) não apresentou complicações/comorbidades pós-transplante ou não possuía esta informação relatada em seus prontuários (Tabela 1).

## **5.2 Distribuição dos pacientes transplantados renais em subgrupos**

Os pacientes transplantados renais envolvidos neste estudo foram distribuídos em subgrupos, de modo a identificar fases distintas com relação à condição clínica dos mesmos, bem como à terapia imunossupressora. A categorização em subgrupos foi definida em conjunto com os médicos dos serviços participantes do estudo.

O primeiro parâmetro utilizado para a distribuição dos pacientes foi a função renal, baseando-se nos níveis plasmáticos de creatinina. Dessa forma, foram constituídos três subgrupos, a saber: C1: creatinina < 1,4mg/dL (n=74), C2: 1,4 a 2,0mg/dL (n=60) e C3: > 2,0mg/dL (n=26). Os valores de creatinina foram obtidos dos prontuários médicos e os resultados se referem ao dia da coleta de sangue.

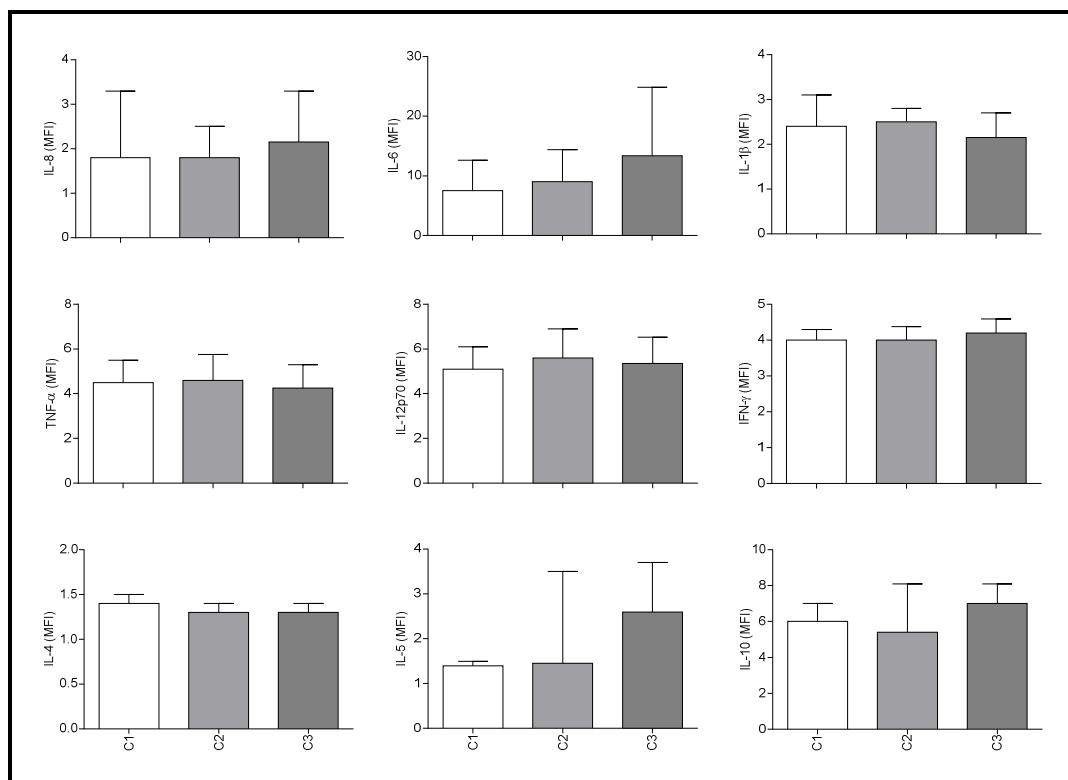
O segundo parâmetro para a distribuição dos pacientes foi o tempo pós-transplante, T1=1-24 meses (n=41), T2=25-60 meses (n=40), T3=61-120 meses (n=40) e T4=>120 meses (n=39) pós-transplante.

## **5.3 Avaliação das citocinas em função dos níveis plasmáticos de creatinina**

Os níveis plasmáticos de seis citocinas (IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-10) foram determinados em 120 pacientes e três citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-5) foram determinadas em 49 pacientes por citometria de fluxo. Esta metodologia é amplamente utilizada para detectar ativação celular. Os dados obtidos podem ser analisados de duas formas distintas; pelo percentual de partículas que expressam antígenos na superfície; ou pela intensidade média de fluorescência (MFI – *mean intensity fluorescence*) da população de partículas que expressa esse antígeno. A primeira estratégia é útil quando se sabe que o biomarcador é restrito a uma subpopulação e a segunda, quando se tratam de biomarcadores constitutivos. A MFI

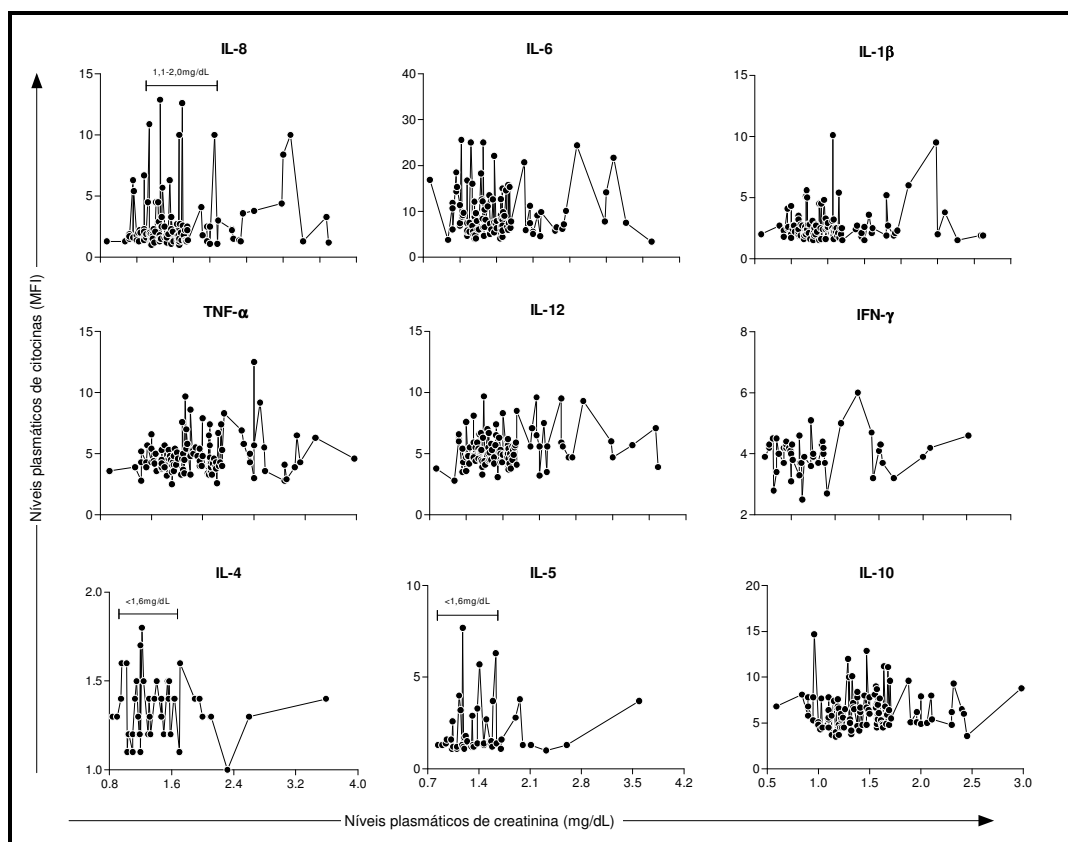
permitiria a distinção de valores que estão nos extremos da faixa de linearidade (KONIJNENBERG et al., 1997). Os resultados do presente estudo estão expressos em MFI.

A comparação estatística das medianas dos níveis plasmáticos de citocinas (MFI) foram feitas em função das concentrações de creatinina (C1: creatinina <1,4mg/dL, n=55; C2: creatinina 1,4-2,0mg/dL, n=45 e C3: creatinina >2,0mg/dL, n=20) e estão mostradas na figura 8. Não foram obtidas diferenças comparando-se os três subgrupos. No entanto, houve uma tendência ao aumento de IL-6 no subgrupo C3 em relação ao C1 (p=0,058).



**Figura 8 – Níveis plasmáticos (MFI) de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras nos subgrupos de pacientes transplantados renais, em função das concentrações de creatinina. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil de IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12, IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-10. C1:creatinina <1,4mg/dL; C2:creatinina 1,4-2,0mg/dL e C3:creatinina >2,0mg/dL.**

Uma nova estratégia de análise das citocinas plasmáticas em pacientes transplantados renais incluiu o estudo das médias móveis de cada citocina (MFI) em relação aos níveis plasmáticos de creatinina, como apresentado na figura 9.

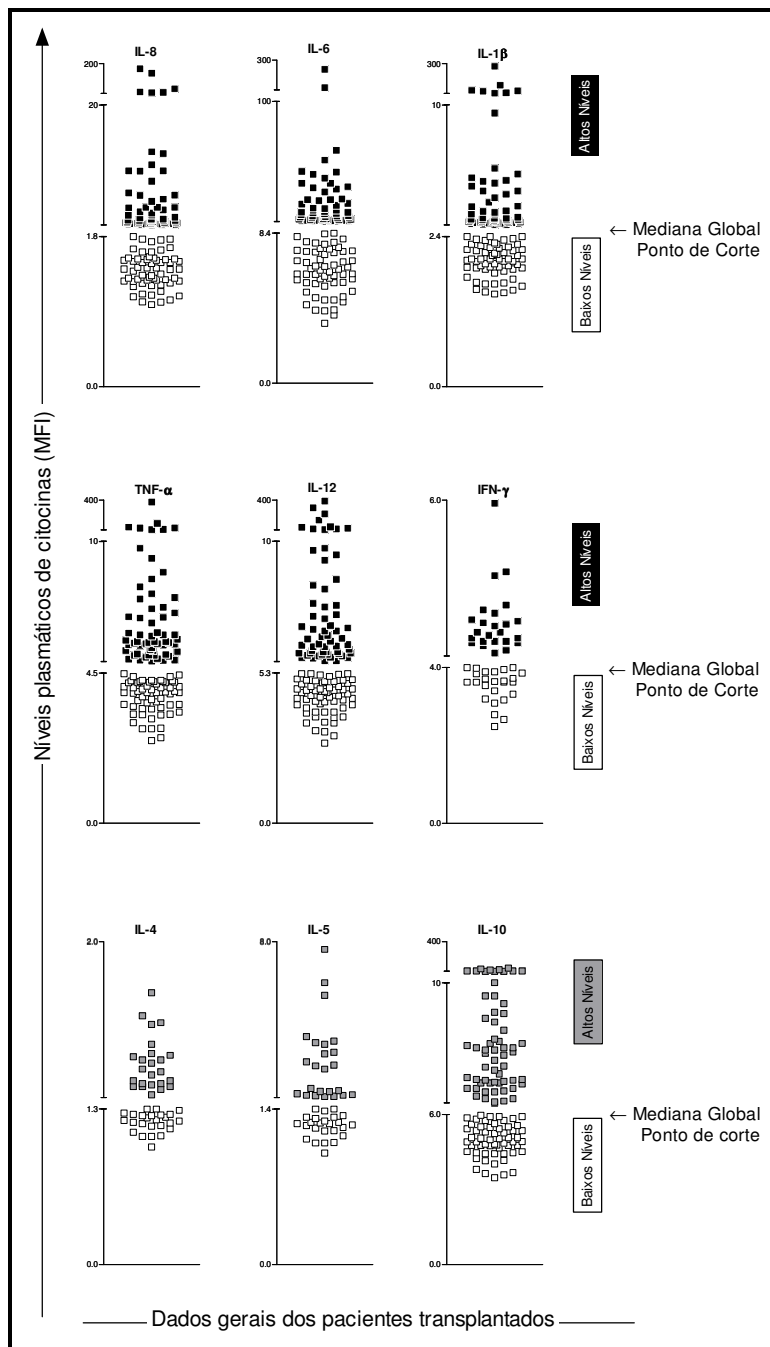


**Figura 9 – Perfil de citocinas (MFI) em pacientes transplantados renais em função dos níveis plasmáticos de creatinina (0,5 a 4,0mg/dL). Dados apresentados como média móvel dos níveis plasmáticos de IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10. Os pontos representam cada indivíduo participante. As linhas horizontais destacam as faixas de creatinina associadas às tendências de elevação das citocinas.**

Um predomínio de citocinas reguladoras, com tendência à elevação de IL-4 e IL-5, foi observado nos pacientes com creatinina <1,6mg/dL, enquanto níveis mais elevados da citocina pró-inflamatória IL-8 foram observados nos pacientes com creatinina entre 1,1 e 2,0mg/dL. Para as demais citocinas avaliadas não foram observadas tendências à elevação associadas às concentrações plasmáticas de creatinina.

Visando a melhor caracterização do perfil de citocinas em pacientes transplantados renais, a mediana de cada citocina, considerando os valores obtidos para todos os participantes, foi calculada e utilizada como *cut off* para classificar os pacientes como “baixos” ou “altos” produtores de citocinas e, dessa forma, obter um

panorama global das citocinas plasmáticas nos pacientes transplantados renais. A figura 10 ilustra o perfil dos pacientes que foram classificados como baixos (□) ou altos produtores, em relação às citocinas reguladoras (▤) e pró-inflamatórias (■).

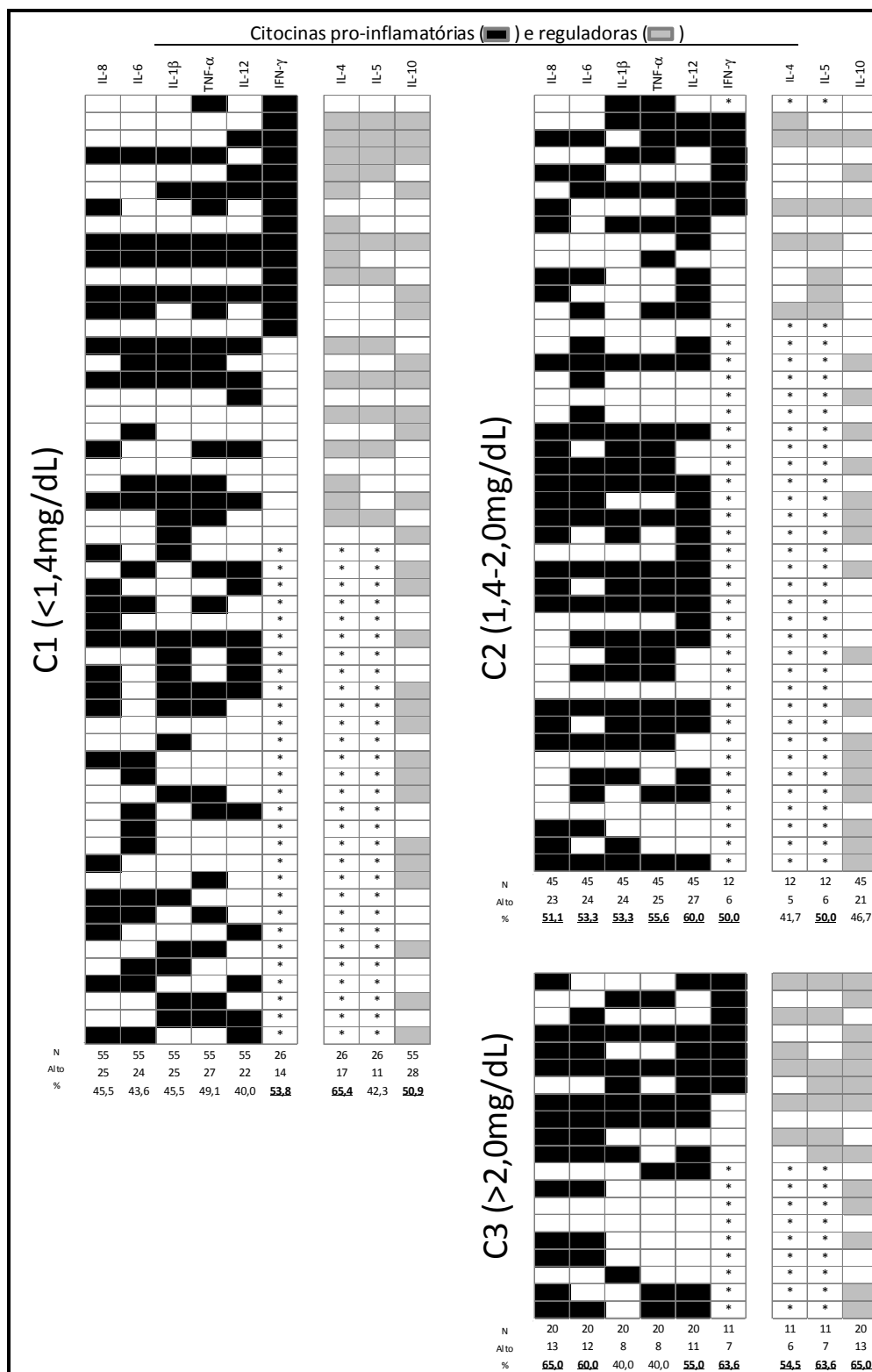


**Figura 10-** Categorização dos pacientes transplantados renais como “baixos” (□) ou “altos” produtores de citocinas pró-inflamatórias (■) ou reguladoras (▤), de acordo com a mediana global obtida para cada citocina. IL-8:interleucina 8. IL-6:interleucina 6. IL-1 $\beta$ : interleucina 1 beta. TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral do tipo alfa. IL-12: interleucina 12. IFN- $\gamma$ : interferon gama. IL-4: interleucina 4. IL-5: interleucina 5. IL-10: interleucina 10.

Os valores das medianas globais para cada citocina foram: IL-8=1,8; IL-6=8,4; IL-1 $\beta$ =2,4; TNF- $\alpha$ =4,5; IL-12p70=5,3; IFN- $\gamma$ =4,0; IL-4=1,3; IL-5=1,4 e IL-10=6,0. Foram considerados altos produtores os pacientes que possuíam nível de citocina acima da mediana global determinada. Posteriormente, diagramas em escala de cinza (Figura 11) foram criados para calcular a frequência (%) de pacientes que exibiam níveis elevados de citocinas, de acordo com as medianas globais das citocinas obtidas na figura 10. Esta análise de frequência foi feita por subgrupo relativo aos níveis plasmáticos de creatinina (C1:<1,4mg/dL, n=55; C2:1,4 a 2,0mg/dL, n=45 e C3:>2,0mg/dL, n=20) e foram consideradas elevadas as frequências iguais ou maiores que 50%.

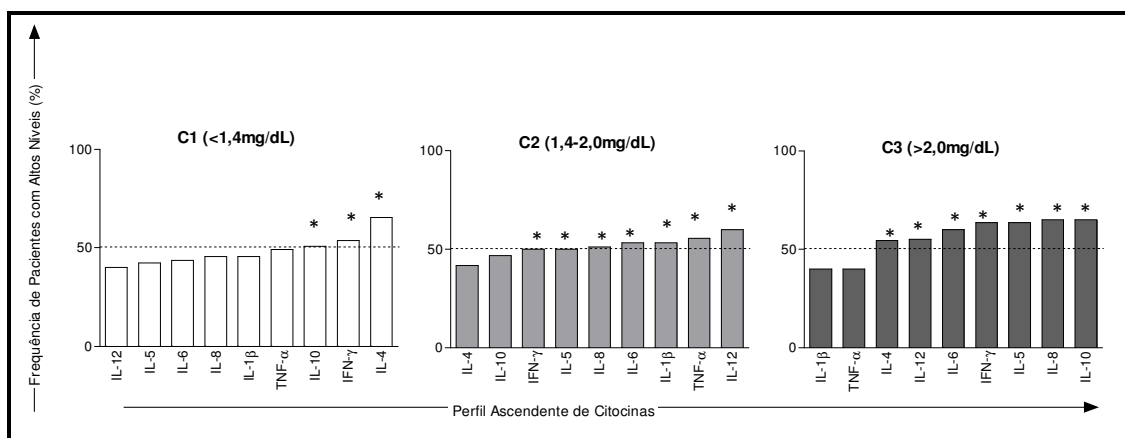
Cada linha na tabela do diagrama representa um paciente transplantado, o símbolo (■) representa as citocinas pró-inflamatórias, o (▣) as citocinas reguladoras, ambos para os pacientes altos produtores, e o símbolo (□), os pacientes baixos produtores de citocinas. Os quadradinhos preenchidos com asterisco (\*) indicam que a citocina em questão não foi determinada para aquele paciente. As frequências iguais ou maiores que 50% de pacientes altos produtores (acima da mediana global) estão marcadas em negrito e sublinhadas (Figura 11).

Os resultados mostraram que os pacientes do subgrupo C1 exibiam frequências  $\geq$ 50% de duas citocinas reguladoras (IL-4=65,4% e IL-10=50,9%) e uma citocina pró-inflamatória (IFN- $\gamma$ =53,8%). Os pacientes do subgrupo C2 apresentaram frequência elevada ( $\geq$ 50%) de todas as citocinas pró-inflamatórias avaliadas, sendo IL-8=51,1%, IL-6=53,3%, IL-1 $\beta$ =53,3%, TNF- $\alpha$ =55,6%, IL-12=60% e IFN- $\gamma$ =50% e da citocina reguladora IL-5 (=50%). Os pacientes do subgrupo C3 apresentaram um perfil equilibrado de citocinas pró-inflamatórias (IL-8=65%, IL-6=60%, IL-12=55% e IFN- $\gamma$ =63,6%) e reguladoras (IL-4=54,5%, IL-5=63,6%, IL-10=65%), e esse foi o subgrupo que exibiu as maiores frequências de pacientes considerados altos produtores de citocinas (Figura 11).



**Figura 11** -Frequência (%) de pacientes baixos (□) e altos produtores de citocinas pró-inflamatórias (■) e reguladoras (□). N=número de pacientes avaliados; Alto=número de pacientes considerados altos produtores; %=porcentagem de pacientes considerados altos produtores.

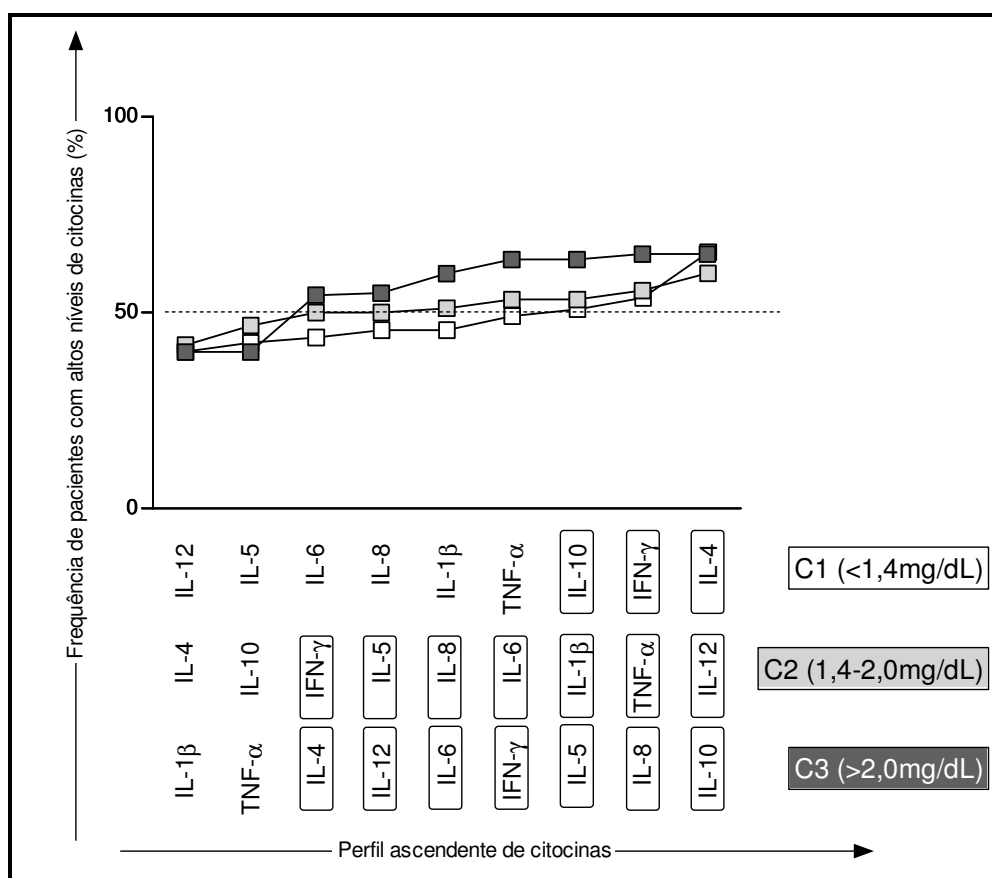
Para melhor compreensão da resposta imune em função dos níveis plasmáticos de creatinina, foi elaborado um perfil ascendente de citocinas (Figura 12), utilizando a frequência de 50%, obtida na figura 11. As colunas representam as frequências de elevação obtidas para cada citocina e estão dispostas em ordem crescente, da esquerda para a direita, por subgrupo (C1, C2 e C3). As linhas pontilhadas horizontais representam a frequência de 50%, sendo consideradas elevadas aquelas acima deste limite.



**Figura 12-** Perfil ascendente de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função dos níveis plasmáticos de creatinina. \*Citocinas com frequência de elevação  $\geq 50\%$ .

Os dados obtidos revelaram que no subgrupo C1 o perfil ascendente de citocinas era caracterizado por IL-4>IFN- $\gamma$ >IL-10, sem destaque ( $\geq 50\%$ ) para as demais citocinas avaliadas. O perfil encontrado permite inferir que as citocinas reguladoras IL-4 e IL-10 e a pró-inflamatória IFN- $\gamma$  estão associadas aos pacientes com níveis mais reduzidos de creatinina (<1,4mg/dL). Por outro lado, o subgrupo C2 (creatinina: 1,4 a 2,0) exibiu um perfil ascendente de citocinas predominantemente pró-inflamatório, sendo IL-12>TNF- $\alpha$ >IL-1 $\beta$ >IL-6>IL-8>IL-5>IFN- $\gamma$ , o que permite inferir que a elevação dos níveis plasmáticos de creatinina está associada ao aumento de citocinas pró-inflamatórias. O subgrupo C3 apresentou um perfil equilibrado de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, caracterizado por IL-10=IL-8>IL-5=IFN- $\gamma$ >IL-6>IL-12>IL-4. Este perfil de citocinas permite inferir que a elevação mais pronunciada de creatinina plasmática (>2,0mg/dL) ativaria a produção de citocinas reguladoras, visando antagonizar (*down regulation*) as citocinas pró-inflamatórias expressas neste subgrupo (C3).

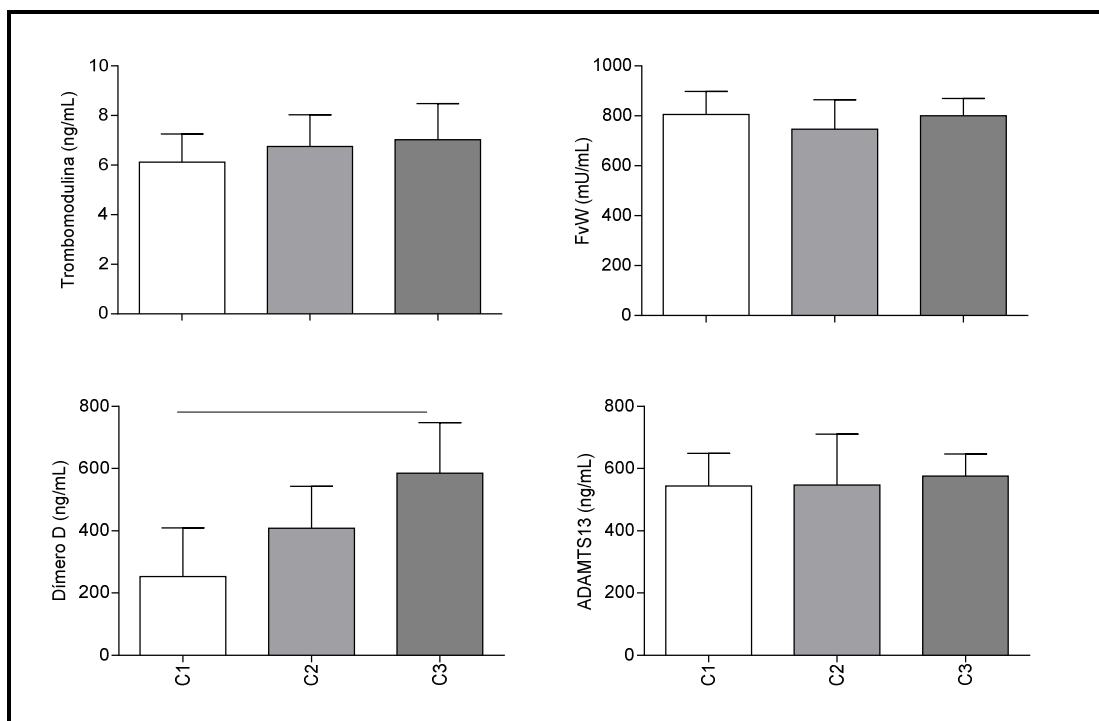
A análise final do perfil ascendente permitiu a obtenção de uma curva de “assinatura de citocinas” em função dos níveis plasmáticos de creatinina (Figura 13). Cada quadradinho representa uma citocina avaliada nos subgrupos C1, C2, e C3. A linha horizontal pontilhada representa a frequência de 50% e os valores iguais ou acima dessa foram considerados elevados. As linhas de conexão mostram que a assinatura de citocinas foi diferente para cada subgrupo, tendo maior expressão de IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10 no subgrupo C1, de IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-5 e IFN- $\gamma$  no C2 e de IL-10, IL-8, IL-5, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-12 e IL-4 no C3. Cumpre ressaltar que o perfil de assinatura de citocinas revelou uma tendência à homogeneidade das frequências dessas nos três subgrupos avaliados (Figuras 12 e 13).



**Figura 13 - Assinaturas de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função dos níveis plasmáticos de creatinina.**

## 5.5 Avaliação dos parâmetros hemostáticos em função dos níveis plasmáticos de creatinina

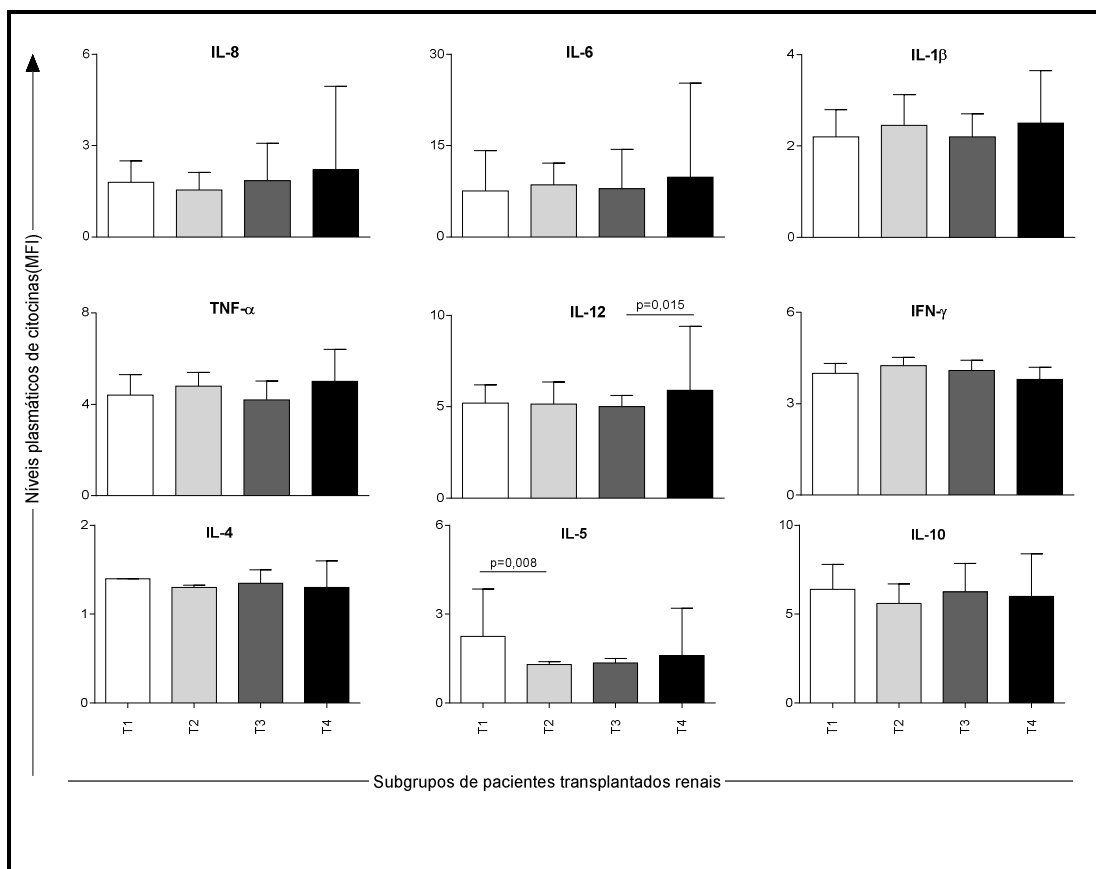
Os parâmetros hemostáticos TM, FvW, D-Di e ADAMTS13 foram avaliados nos 160 pacientes participantes do estudo, em função dos níveis plasmáticos de creatinina nos subgrupos C1, C2 e C3 e foi encontrado um aumento significativo de D-Di no subgrupo C3 em relação ao C1 ( $p=0,002$ ). Para as demais comparações não foram observadas diferenças (TM,  $p=0,097$ ; FvW,  $p=0,360$  e ADAMTS13,  $p=0,339$ ), como mostra a figura 14.



**Figura 14-** Níveis plasmáticos de parâmetros hemostáticos nos subgrupos (C1, C2 e C3) de pacientes transplantados renais, em função das concentrações de creatinina. A linha horizontal mostra diferença significativa entre os subgrupos. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartilico. TM:trombomodulina. FvW:fator von Willebrand. D-Di:dímero D. ADAMTS-13:A *Desintegrin And Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like-member 13*. C1:creatinina <1,4mg/dL; C2:creatinina 1,4-2,0mg/dL e C3:creatinina >2,0mg/dL.

## 5.6 Avaliação de citocinas em função do tempo pós-transplante

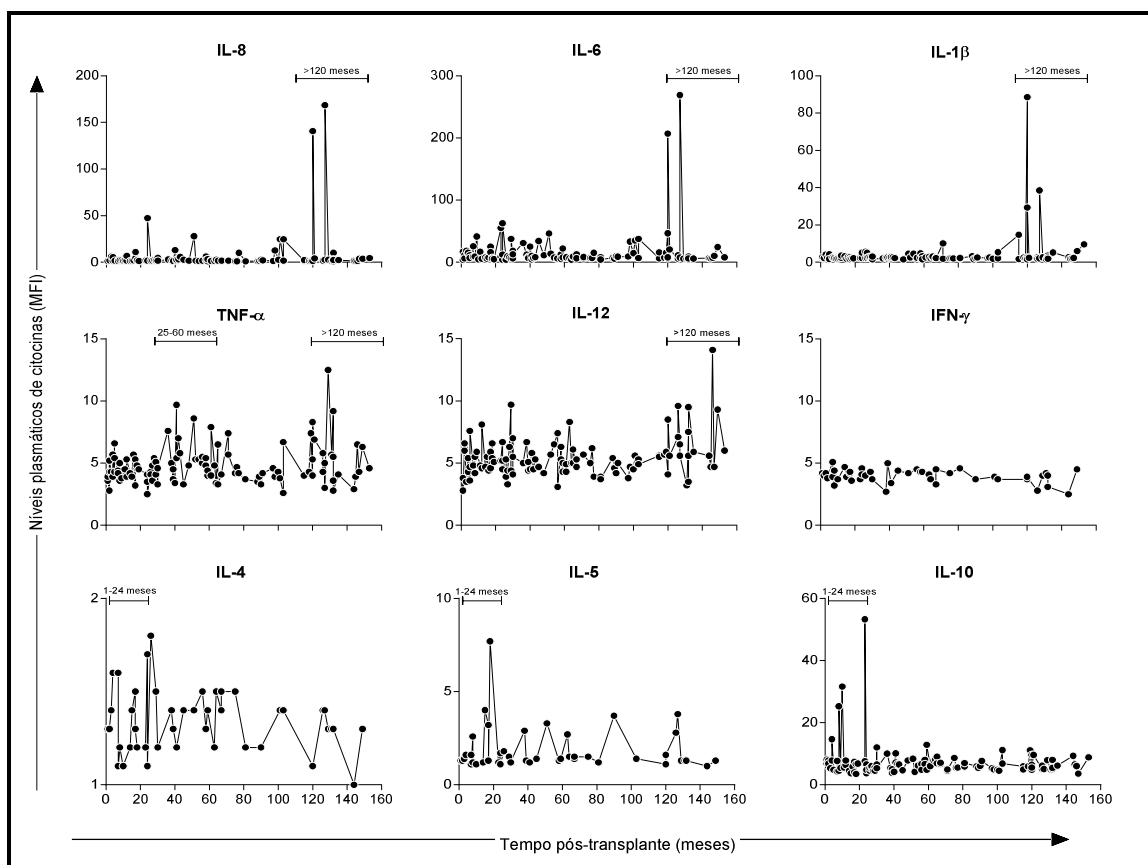
A comparação estatística das medianas dos níveis plasmáticos de citocinas (MFI), por subgrupo em função do tempo pós-transplante, revelou níveis significativamente maiores de IL-5 ( $p=0,008$ ) no subgrupo T1 (1-24 meses) em relação ao T2 (25-60 meses). Além disso, níveis elevados de IL-12 ( $p=0,015$ ) foram observados no subgrupo T4 (>120 meses) em relação ao T3 (61-120 meses). Não foram observadas diferenças significativas para as medianas das demais citocinas avaliadas (Figura 15).



**Figura 15 – Níveis plasmáticos das citocinas (MFI) por subgrupos de pacientes transplantados renais, em função do tempo pós-transplante. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartílico de IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70, IFN-γ, IL-4, IL-5 e IL-10. As linhas horizontais mostram as diferenças significativas ( $p \leq 0,05$ ). T1:1-24 meses. T2:25-60 meses. T3:61-120 meses. T4: >120 meses pós-transplante.**

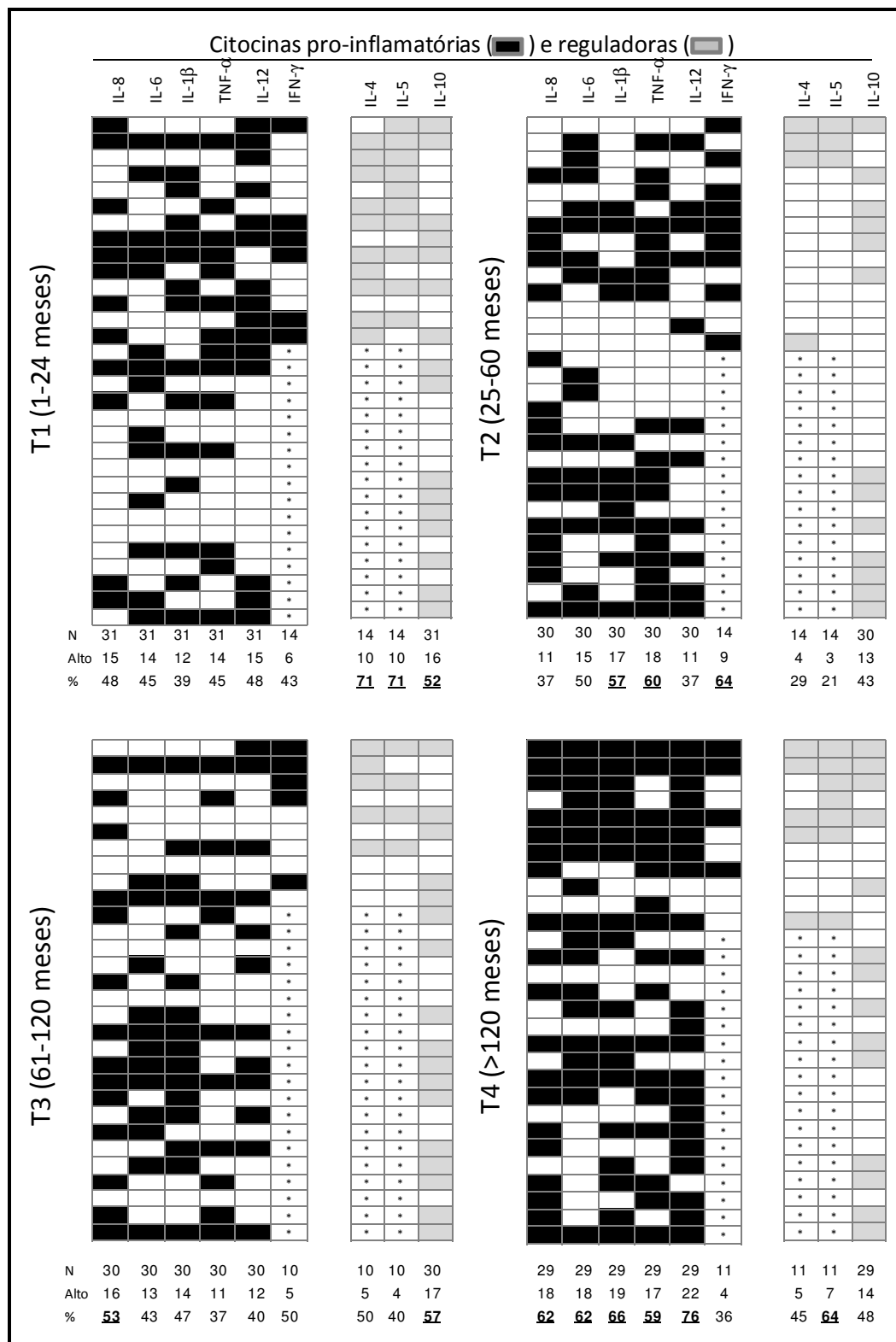
De modo similar ao que foi descrito para a distribuição dos pacientes em subgrupos em função dos níveis plasmáticos de creatinina, as médias móveis de

cada citocina (MFI) foram analisadas em função do tempo pós-transplante <160 meses (n=114) e estão apresentadas na figura 16. Uma predominância de citocinas reguladoras, a curto prazo, com tendência à elevação de IL-4, IL-5 e IL-10 foi observada no subgrupo T1 (1-24 meses), enquanto níveis mais elevados de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL-1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-12p70) foram observados a longo prazo pós-transplante (T4:>120 meses). Uma tendência à elevação de TNF- $\alpha$  também foi obtida nos pacientes com 25-60 meses pós-transplante (T2). Não houve tendência à elevação de nenhuma citocina no T3 (61-120 meses pós-transplante) e os níveis de IFN- $\gamma$  permaneceram estáveis em todos os pacientes avaliados, como mostra a figura 16.



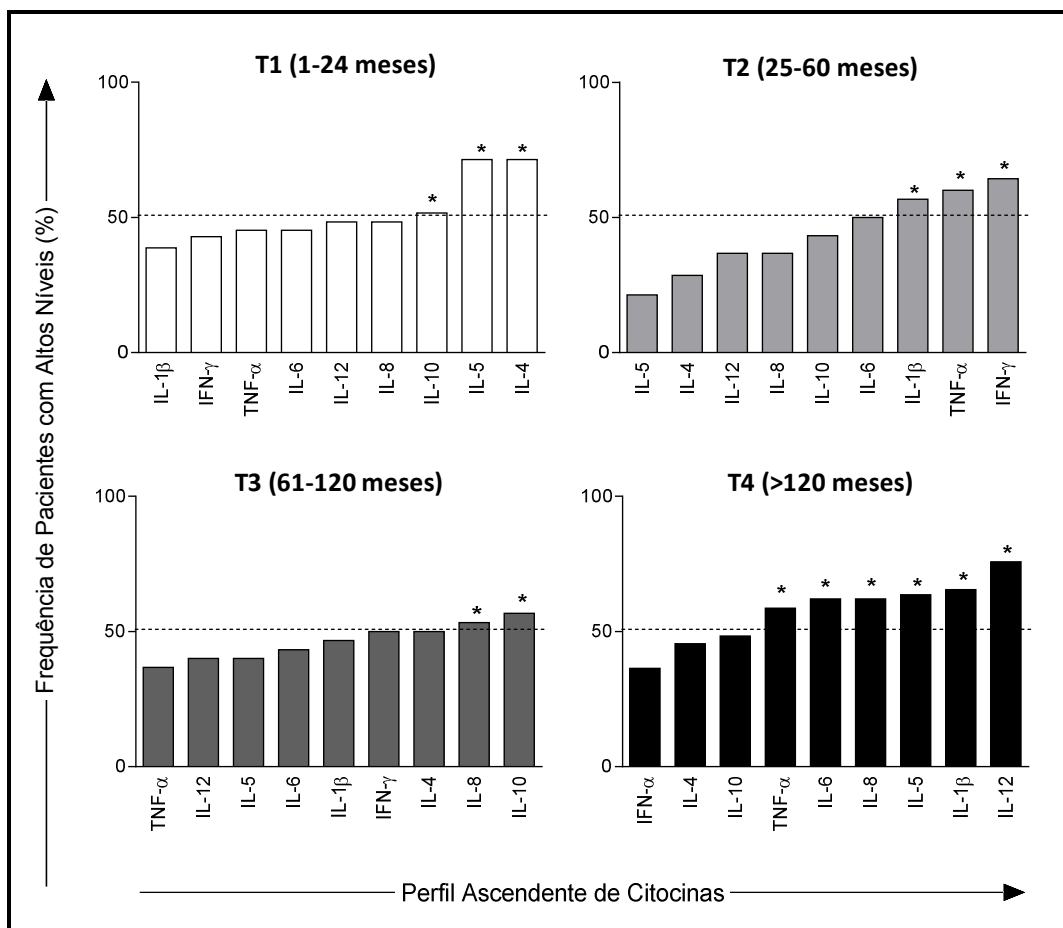
**Figura 16-** Perfil de citocinas (MFI) em pacientes transplantados renais. Dados apresentados como média móvel dos níveis plasmáticos de IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5 e IL-10 em função do tempo pós-transplante (1-160 meses). Os pontos representam cada indivíduo participante. As linhas horizontais destacam os períodos pós-transplante associados às tendências de elevação das citocinas.

Diagramas em escalas de cinza (Figura 17) foram posteriormente criados para calcular, em cada subgrupo, T1 (n=31), T2 (n=30), T3 (n=30) e T4 (n=29), a frequência (%) de pacientes que exibiam níveis elevados de citocinas, de acordo com as medianas globais obtidas (Figura 10). Foram consideradas elevadas as frequências acima de 50%. Os resultados mostraram que os pacientes do subgrupo T1 (1-24 meses pós-transplante) exibiram frequências >50% das citocinas reguladoras (IL-4=71%; IL-5=71%; IL-10=52%) e pacientes do subgrupo T2 (25-60 meses pós-transplante) apresentaram frequências elevadas das citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ =57%; TNF- $\alpha$ =60%; IFN- $\gamma$ =64%). Os pacientes do subgrupo T3 (61-120 meses pós-transplante) apresentaram um perfil equilibrado de citocinas pró-inflamatória (IL-8=53%) e reguladora (IL-10=57%) e os pacientes do T4 (>120 meses pós-transplante) apresentaram um perfil predominantemente pró-inflamatório (IL-8=62%; IL-6=62%; IL-1 $\beta$ =66%; TNF- $\alpha$ =59%; IL-12p70=76%), embora tivessem também uma frequência elevada de IL-5 (64%), como mostra a figura 17.



**Figura 17-Frequência (%) de pacientes baixos (□) e altos produtores de citocinas pró-inflamatórias (■) e reguladoras (□), em função do tempo pós-transplante. N=número de pacientes avaliados; Alto=número de pacientes considerados altos produtores; %=porcentagem de pacientes considerados altos produtores.**

O perfil ascendente de citocinas em função do tempo pós-transplante, utilizando como referência a frequência de 50% obtida no diagrama anterior está apresentado na figura 18.



**Figura 18 - Perfil ascendente de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais.**

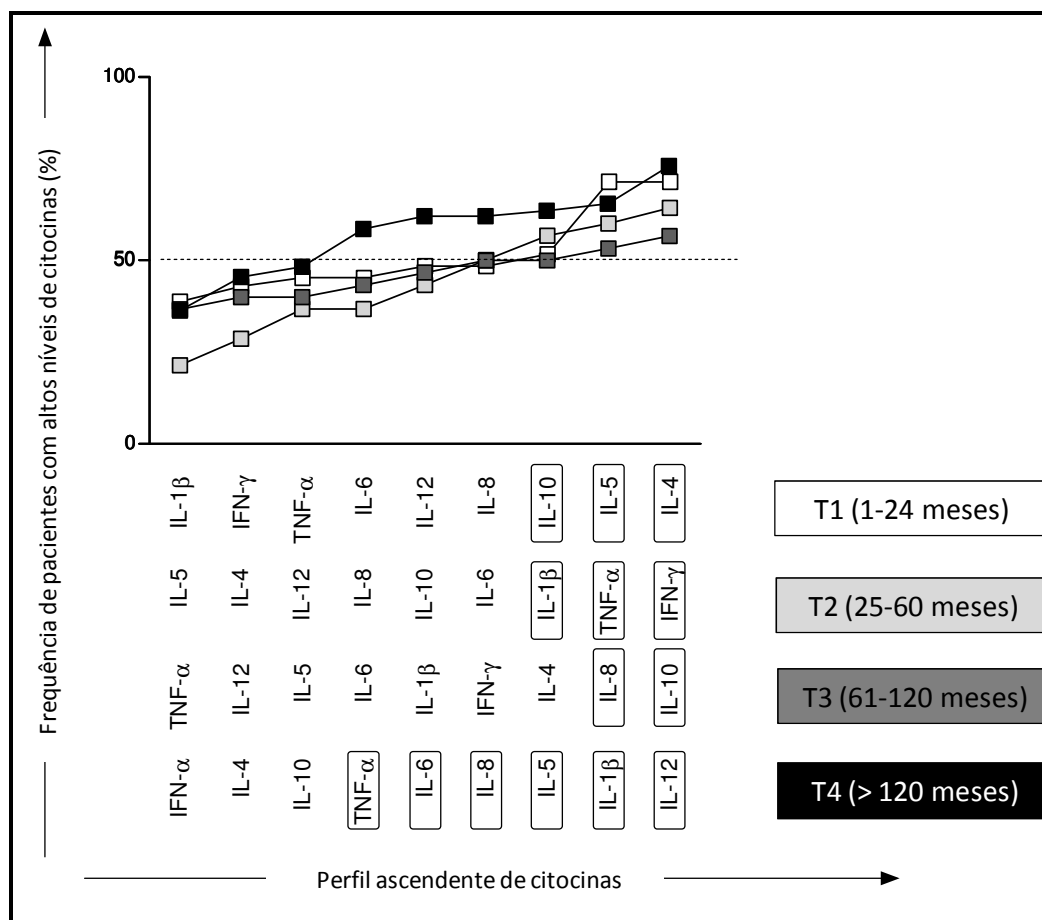
\*Citocinas com frequência de elevação maior que 50%.

Os dados obtidos revelaram que no subgrupo T1 o perfil ascendente de citocinas era caracterizado por IL-4=IL-5>IL-10, sem destaque (>50%) para as demais citocinas avaliadas. O perfil ascendente encontrado permite inferir que as citocinas reguladoras estão associadas à função renal do enxerto a curto prazo pós-transplante. Por outro lado, o subgrupo T2 exibiu um perfil ascendente de citocinas predominantemente pró-inflamatório, sendo IFN- $\gamma$ >TNF- $\alpha$ >IL-1 $\beta$ , sem destaque para as demais citocinas avaliadas (<50%). O subgrupo T3 foi caracterizado por um perfil equilibrado de citocinas reguladora e pró-inflamatórias, sendo IL-10>IL-8, sem

destaque para as demais citocinas. O subgrupo T4 exibiu um perfil de citocinas predominantemente pró-inflamatório, sendo  $IL-12 > IL-1\beta > IL-5 > IL-8 = IL-6 > TNF-\alpha$ .

A curva de “assinaturas de citocinas” está apresentada na figura 19, onde cada quadradinho representa uma citocina avaliada nos subgrupos T1, T2, T3 e T4. A linha horizontal pontilhada representa a frequência de 50% e os valores acima dessa foram considerados elevados. As linhas de conexão mostram que a assinatura de citocinas foi diferente para cada subgrupo, tendo maior expressão de IL-4, IL-5 e IL-10 no subgrupo T1, de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no T2, de IL-10 e IL-8 no T3 e de IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-8, IL-6 e TNF- $\alpha$  no T4.

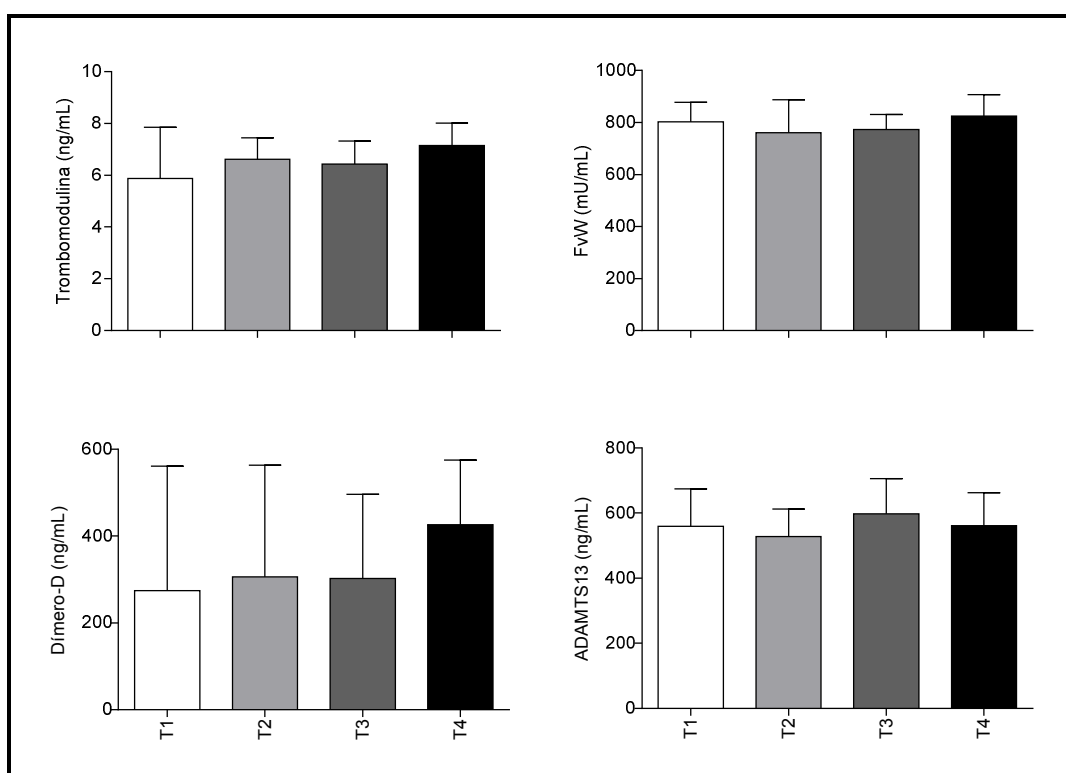
Os dados obtidos permitem inferir que as citocinas pró-inflamatórias, principalmente a IL-12, podem ser promissoras como biomarcadores do estado inflamatório no transplante renal a longo prazo, enquanto que as citocinas reguladoras, principalmente IL-4 e IL-5, parecem ter mais influência a curto prazo pós-transplante (Figuras 18 e 19).



**Figura 19 - Assinaturas de citocinas por subgrupos de pacientes transplantados renais.**

## 5.7 Avaliação de parâmetros hemostáticos em função do tempo pós-transplante

As medianas dos valores de TM, ADAMTS13 e D-Di e as médias dos valores de FvW não foram diferentes, comparando-se os subgrupos T1, T2, T3 e T4 ( $p=0,306$ ;  $p=0,133$ ;  $p=0,063$  e  $p=0,643$ , respectivamente). No entanto, houve uma tendência à elevação de D-Di ( $p=0,063$ ) no subgrupo T4 (>120 meses pós-transplante) em relação aos demais subgrupos (Figura 20).



**Figura 20 - Níveis plasmáticos de parâmetros hemostáticos nos subgrupos (T1, T2, T3 e T4) de pacientes transplantados renais, em função do tempo pós-transplante. Dados apresentados como mediana e intervalo interquartilico de TM, D-Di e ADAMTS-13 e como média e desvio padrão de FvW. Não foram observadas diferenças significativas entre os subgrupos. T1= 1-24 meses, T2=25-60 meses, T3=61 a 120 meses e T4>120 meses.**

## **5.8 Associação dos parâmetros inflamatórios, hemostáticos e clínicos com a função renal**

A associação das citocinas, dos marcadores hemostáticos e dos parâmetros clínicos com a função renal foi investigada por meio das seguintes variáveis resposta:

1. Níveis plasmáticos de creatinina (C1:<1,4mg/dL; C2:1,4-2,0mg/dL e C3:>2,0mg/dL). A categoria de referência para creatinina plasmática foi menor que 1,4mg/dL (parâmetro de normalidade).
2. Ritmo de filtração glomerular (eRFG) estimado pela fórmula MDRD simplificada (Homens=  $175 \times \text{creatinina plasmática}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203}$ ) e (Mulheres=  $175 \times \text{creatinina plasmática}^{-1,154} \times \text{idade}^{-0,203} \times 0,742$ ), considerando eRFG menor ou maior que 60mL/min/1,73m<sup>2</sup>. A categoria de referência para eRFG foi eRFG≥60mL/min/1,73m<sup>2</sup> (parâmetro de normalidade).

### **5.8.1 Associação dos parâmetros avaliados com os níveis plasmáticos de creatinina**

A análise preliminar, de regressão multinomial univariada, revelou associação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os níveis plasmáticos de creatinina e algumas variáveis explicativas de interesse: tempo pós-transplante, TM e D-Di. As variáveis sexo, idade, IFN- $\gamma$ , IL-5, IL-10, ADAMTS13 e FvW apresentaram  $p < 0,20$ , indicando uma possível associação com os níveis plasmáticos de creatinina e também foram incluídas na análise posterior, multivariada (Tabela 2).

**Tabela 2 – Análise de regressão multinomial univariada em função dos níveis plasmáticos de creatinina.**

	Variáveis	Coefficiente	IC 95%	valor de p
Creatinina 1,4-2,0mg/dL	Sexo	-0,02	-0,73;0,69	0,95
	Idade	-0,20	-1,00;0,62	0,64
	Tempo pós-transplante	0,48	-0,51;1,47	0,34
	IFN- $\gamma$	0,44	-0,73;1,63	0,46
	IL-5*	0,54	-0,08;1,15	0,09
	IL-10*	0,83	-0,03;0,20	0,16
	TM*	0,12	-0,03;0,26	0,11
	DDi*	0,00	0,00;0,01	0,09
	ADAMTS13*	0,00	0,00;0,01	0,17
	FvW*	0,00	0,00;0,01	0,16
Creatinina >2,0mg/dL	Sexo*	-0,99	-2,06;0,82	0,07
	Idade*	-0,67	-1,66;0,32	0,18
	Tempo pós-transplante*	1,75	-3,38;-1,27	0,03
	IFN- $\gamma$ *	0,91	-0,35;2,15	0,16
	IL-5*	0,60	-0,02;1,21	0,06
	IL-10*	0,10	-0,02;0,22	0,11
	TM*	0,17	0,18;0,33	0,03
	DDi*	0,00	0,00;0,01	0,01
	ADAMTS13*	0,00	0,00;0,01	0,17
	FvW*	0,00	0,00;0,01	0,45

$p \leq 0,05$ : significativo. \* $p < 0,20$ . Categoria de referência: creatinina  $< 1,4$ mg/dL.

Para as demais variáveis explicativas de interesse, IMC, tempo de hemodiálise, terapia imunossupressora, IL-8, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12 e IL-4 o valor de p foi maior que 0,20. As variáveis explicativas que tiveram  $p \leq 0,20$  foram inseridas, posteriormente, na análise multivariada. Cumpre ressaltar que não foi possível fazer a análise de regressão multinomial univariada para os parâmetros causas primárias da DRC, PRA pré-transplante e comorbidades pós-transplante, por apresentarem frequência elevada de dados não informados.

A análise posterior, de regressão multinomial multivariada, revelou permanência de associação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre os níveis plasmáticos de creatinina e níveis plasmáticos de ADAMTS13 (Tabela 3).

**Tabela 3 – Coeficiente de associação, intervalo de confiança (IC) e valor de p do modelo da regressão multinomial multivariada, considerando como variável resposta os níveis plasmáticos de creatinina.**

	Variáveis	Coeficiente	IC 95%	valor de p
Creatinina 1,4-2,0mg/dL	Sexo feminino	0,05	-2,05;2,16	0,96
	Idade	-0,34	-1,42;0,75	0,54
	Tempo pós-transplante	0,39	-0,64;1,41	0,46
	IFN- $\gamma$	0,44	-0,74;1,62	0,46
	IL-5	0,22	-0,63;1,06	0,16
	IL-10	-0,41	-0,99;0,16	0,61
	TM	0,51	-0,16;1,17	0,14
	DDi	0,00	0,00;0,01	0,87
	ADAMTS13	0,00	0,00;0,01	0,85
	FvW	-0,00	-0,14;0,00	0,08
Creatinina >2,0mg/dL	Sexo feminino	1,23	-1,62;4,09	0,39
	Idade	-0,63	-1,94;0,71	0,36
	Tempo pós-transplante	-0,55	-1,73;0,62	0,35
	IFN- $\gamma$	0,90	-0,34;2,15	0,15
	IL-5	-0,35	-1,05;0,97	0,13
	IL-10	0,57	-0,16;1,29	0,95
	TM	0,67	-0,16;1,50	0,11
	DDi	0,00	0,00;0,01	0,44
	ADAMTS13*	0,01	0,00;0,02	0,05
	FvW	0,00	0,00;0,01	0,24

$p \leq 0,05$ : significativo. IC: intervalo de confiança. IL-5: interleucina 5. IL-10: interleucina 10. TM: trombomodulina. D-Di: dímero D. ADAMTS13: *A Desintegrin And Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like-member 13*. FvW: fator von Willebrand. Categoria de referência: creatinina < 1,4mg/dL.

### **5.8.2 Associação dos parâmetros avaliados com o ritmo de filtração glomerular (eRFG)**

Considerando as duas categorias da variável resposta eRFG (< e  $\geq 60 \text{ mL/min/1,73m}^2$ ), a análise preliminar de regressão logística univariada, revelou associação significativa ( $p \leq 0,05$ ) entre o eRFG e algumas variáveis explicativas de interesse: sexo e D-Di. As variáveis tempo pós-transplante, tempo de hemodiálise, IL-6, TM e ADAMTS13 tiveram  $p \leq 0,20$ , indicando uma possível associação com o eRFG e também foram incluídas na análise posterior, multivariada (Tabela 4).

**Tabela 4 – Análise de regressão logística univariada em função do ritmo de filtração glomerular (eRFG)**

Variáveis	Odds ratio	IC 95%	valor de p
Sexo*	4,72	1,95;11,4	0,001
Tempo pós-transplante*	2,56	0,94;6,94	0,06
Tempo de hemodiálise*	3,23	0,87;12,1	0,08
IL-6*	1,03	0,98;1,08	0,19
TM*	1,13	0,96;1,32	0,13
D-Di*	1,00	1,00;1,01	0,04
ADAMTS13*	1,00	0,99;1,00	0,20

$p \leq 0,05$ : significativo. \* $p < 0,20$ . Categoria de referência: eRFG  $\geq 60$  mL/min/1,73m<sup>2</sup>.

Para as demais variáveis explicativas (idade, IMC, terapia imunossupressora, IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-5, IL-10 e FvW) o valor de p foi maior que 0,20.

A análise posterior, de regressão logística multivariada, revelou que o sexo feminino, o tempo pós-transplante (T3:61-120 meses) e o D-Di permaneceram associados estatisticamente ( $p \leq 0,05$ ) ao eRFG (Tabela 5).

**Tabela 5 – Odds ratio, intervalo de confiança (IC) e valor de p do modelo de regressão logística multivariada, considerando como variável resposta o eRFG**

Variáveis	Odds ratio	IC 95%	valor de p
Sexo feminino*	14,6	2,96;71,4	0,001
T2	1,14	0,33;3,97	0,84
T3*	3,93	1,02;15,1	0,04
T4	2,49	0,58;10,7	0,22
Tempo de hemodiálise	2,39	0,42;13,6	0,32
IL-6	1,01	0,97;1,06	0,57
TM	1,18	0,88;1,59	0,27
D-Di*	1,00	1,00;1,01	0,04
ADAMTS13	1,00	0,99;1,00	0,12

\* $p \leq 0,05$ : significativo. IC: intervalo de confiança. T2: 25-60 meses pós-transplante. T3: 61-120 meses pós-transplante. T4: >120 meses pós-transplante. IL-6: interleucina 6. TM: trombosmodulina. D-Di: dímero D. ADAMTS13: *A Desintegrin And Metalloprotease with eight Thrombospondin-1-like-member 13*.

## *6 DISCUSSÃO*

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Características clínicas dos pacientes transplantados renais

No presente estudo foram avaliados 160 pacientes submetidos ao transplante de rim, com função renal estável, sendo 103 pacientes (64,4%) do sexo masculino e 57 (35,6%) do sexo feminino (Tabela 1). A maior porcentagem de indivíduos do sexo masculino está de acordo com outros estudos realizados no Brasil, que detectaram maior porcentagem de homens com DRC, em hemodiálise ou transplantados (CASTRO et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2005). Dado semelhante foi obtido na população americana, em 2005, sugerindo que as mulheres possuem uma chance menor de perda da função renal e menor necessidade de hemodiálise e transplante, quando comparadas aos homens (JINDAL et al., 2005).

Em concordância, a Sociedade Brasileira de Nefrologia (SBN) relatou predomínio de pacientes do sexo masculino em tratamento dialítico no Brasil (57,3%), no ano de 2011. Alguns fatores poderiam justificar a maior frequência da doença renal e conseqüentemente do transplante nos homens, como a massa muscular, o tamanho dos rins, a hemodinâmica glomerular, os efeitos dos hormônios sexuais androgênicos e a dieta com maior conteúdo proteico (GANDOLFO et al., 2004; SILBINGER; NEUGARTEN, 2008). Sonoda et al. (2011) associaram o desenvolvimento da DRC aos níveis plasmáticos de ácido úrico, que são mais elevados nos homens, devido à maior síntese endógena e à influência da dieta. Estes pesquisadores concluíram que os níveis de ácido úrico constituem um preditor independente para o desenvolvimento da DRC, embora não seja o critério mais importante. Contrariamente aos dados encontrados em relação ao sexo, Ferreira et al. (2011), em um estudo conduzido em São Paulo, de seguimento de pacientes transplantados renais, por 10 anos, relataram que 53% dos pacientes eram do sexo feminino.

Tem sido observado que embora a frequência da DRC e a necessidade de transplante sejam maiores entre os homens, esses sobrevivem por mais tempo que as mulheres (CARRERO, 2010). Diversas hipóteses têm sido aventadas para explicar este fato. Sabe-se que os determinantes sociais e psicossociais são mais importantes para a saúde das mulheres, e os comportamentais são mais importantes para a saúde dos homens (BARRETO & FIGUEIREDO, 2009). O efeito

psicológico parece contribuir para o pior defecho nas mulheres em relação à DRC. Lopes et al. (2007) avaliaram a qualidade de vida de mulheres em tratamento hemodialítico crônico, por meio de instrumento específico KDQOL-SF (*Kidney Disease Quality of Life Short Form*), e concluíram que essas apresentavam escore de qualidade de vida menor que dos homens. Além disso, o maior cuidado recebido pelos homens com DRC e transplantados, por mulheres do seu círculo familiar, incluindo atenção à dieta, adesão ao tratamento, dentre outros fatores, refletiria na maior sobrevida desses. Ao contrário, a DRC nas mulheres, embora menos frequente, usualmente resulta na morte em um período menor de tempo, muitas vezes antes da realização do transplante, o que está associado à maior incidência de anemia, desnutrição, menopausa e obesidade entre as pacientes do sexo feminino (BASTOS, 2005; BASTOS, 2011).

A comparação das idades dos pacientes transplantados renais não mostrou diferenças entre os homens e as mulheres (Tabela 1). A quase totalidade dos pacientes, 155 (96,9%), tinha idade compreendida entre 19 e 64 anos e apenas cinco (3,1%) tinham mais de 65 anos. Em concordância, a SBN (2011) relatou que 66,9% dos pacientes com DRC, no Brasil, estavam na faixa etária entre 19 e 64 anos e eram candidatos ao transplante renal. A mediana das idades (42 anos) obtida para a população total do presente estudo também está de acordo com o estudo de Ferreira et al. (2011), que obteve mediana das idades igual a 41,9 anos.

Cumpramos ressaltar que apenas dois pacientes (1,25%) realizaram o transplante renal após os 65 anos de idade, sendo um com 66 e o outro com 67 anos. Sabe-se que tanto a idade avançada do receptor do transplante, quanto a idade do doador são consideradas fatores de risco para a menor sobrevida do enxerto (GALLIFORD; GAME, 2009). Alterações anatômicas e fisiológicas podem ocorrer nos rins, decorrentes do processo de envelhecimento e, por este motivo, a idade é considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento da DRC e para as complicações pós-transplante (KUSUMOTA et al., 2004; GRAVES, 2008). Sabe-se, ainda, que é frequente a ocorrência de complicações cardiovasculares pós-transplante renal em pacientes mais velhos, particularmente aquelas decorrentes da doença arterial coronariana. Dessa forma, quanto mais cedo o transplante renal for realizado, maior será a probabilidade de sobrevida, tanto do enxerto, quanto do paciente (GOWDAK et al, 2005).

O índice de massa corporal (IMC) dos pacientes transplantados renais incluídos neste estudo não diferiu entre os homens ( $25,0 \text{ Kg/m}^2$ ) e as mulheres ( $24,1 \text{ Kg/m}^2$ ) como mostra a tabela 1. Em concordância, Gowdak et al. 2005 encontraram  $\text{IMC}=26\pm 4 \text{ Kg/m}^2$  em candidatos ao transplante renal. A manutenção do peso, pré e pós-transplante, é uma condição clínica desejável, uma vez que o ganho de peso e a obesidade ( $\text{IMC}\geq 30$ ) estão associados ao aumento do risco de ocorrência de eventos cardiovasculares precoces, dislipidemia, hipertensão e diabetes mellitus pós-transplante (GOWDAK et al, 2005).

Em relação às causas primárias que levaram à DRC nos pacientes avaliados neste estudo, a nefrosclerose hipertensiva respondeu por 23,8% das causas, seguida pela nefropatia diabética (11,3%) e pelas glomerulopatias crônicas (10,6%), totalizando 45,7% (Tabela 1). A maioria dos pacientes, entretanto, possuía outras causas, etiologia indefinida para a DRC ou dado não informado (54,3%). Em concordância com os dados do presente estudo, a SBN revelou que no Brasil, em 2011, as principais doenças reportadas como causas da DRC foram hipertensão arterial (35,1%), diabetes mellitus (28,4%) e glomerulonefrite crônica (11,4%). De modo similar, Ferreira et al. (2011), em um estudo avaliando pacientes transplantados em São Paulo, relataram que as principais causas primárias da DRC também foram a glomerulonefrite crônica (41,5%), seguida pela hipertensão arterial (14%) e pelo diabetes mellitus (8%).

A hipertensão arterial constitui uma comorbidade importante no pós-transplante. Sabe-se que a hipertensão arterial não controlada pode induzir a hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca e morte prematura do paciente, além de promover a deterioração da função do enxerto, estenose da artéria renal e redução do número de néfrons ativos, reduzindo também a sobrevida do enxerto e do paciente (BENZ et al., 2011).

Acredita-se que o transplante renal realizado com doador vivo melhora, em parte, as complicações decorrentes da hipertensão arterial. Por outro lado, o rim oriundo de doador falecido, a função retardada do enxerto, o aumento do peso corporal e a terapia imunossupressora com inibidores de calcineurina e corticoesteroides são condições associadas ao desenvolvimento da hipertensão arterial pós-transplante (KEW & CURTIS, 2000; BASIC-JUKIC et al., 2007; BENZ et al., 2011).

Neipp, Jackobs & Klempnauer (2009) relataram que a nefropatia diabética pré-transplante, bem como o desenvolvimento do diabetes mellitus pós-transplante são fatores de risco independentes para a disfunção tardia do enxerto e estão associadas ao aumento da morbidade e mortalidade cardiovascular em pacientes transplantados renais. O desenvolvimento do diabetes mellitus no período pós-transplante renal está associado ao uso de imunossuppressores, como corticoides e tacrolimus, ao aumento do IMC e à idade e sua incidência pode variar entre 2 e 54% (JOSS et al., 2007).

No presente estudo, 11,3% dos pacientes tinham nefropatia diabética como causa primária da DRC e 2,5% dos pacientes desenvolveram diabetes pós-transplante. A nefropatia diabética foi significativamente mais frequente em homens que em mulheres. No entanto, é possível que estes dados estejam subestimados, uma vez que alguns pacientes tinham hiperglicemia, detectada nos exames de glicemia em jejum, mas não estavam relatados como diabéticos em seus prontuários. Além disso, muitos dados sobre a causa primária da DRC não estavam disponíveis nos prontuários avaliados.

O tempo médio de hemodiálise pré-transplante foi de 15 meses para a população total do estudo, sendo significativamente maior para os homens (20 meses) que para as mulheres (12 meses), como mostra a Tabela 1. Este dado mostra que as mulheres são submetidas ao transplante mais precocemente, o que corrobora com a premissa de que as mulheres com DRC resistem menos ao processo de hemodiálise.

O tempo de hemodiálise depende do tempo de espera pelo transplante renal que, por sua vez, está associado à disponibilidade e origem do rim transplantado e à sobrevida do órgão após o transplante. Em geral, os pacientes que recebem o rim de doadores vivos permanecem um tempo menor em diálise, que aqueles que recebem o rim de doadores falecidos. Provavelmente isto se deve ao fato de que no primeiro caso, um doador com compatibilidade HLA é encontrado entre as pessoas do círculo familiar do doente. Por outro lado, os que não encontram um doador vivo compatível esperam por muito tempo pelo rim de doador falecido ou doador vivo não aparentado. Um estudo recente, realizado na Noruega, encontrou correlação negativa entre o tempo de hemodiálise realizada antes do transplante e a sobrevida do paciente pós-transplante, sugerindo que quanto menor é a espera pelo transplante, maior é a chance de sucesso do mesmo (HELDAL et al., 2011). De

fato, o tempo maior em diálise e, conseqüentemente, as comorbidades associadas ao tratamento dialítico podem comprometer a sobrevida do enxerto, a longo prazo. As principais causas associadas à perda do enxerto são, nesse caso, a inflamação e a permanência da anemia pós-transplante. Acredita-se que quanto mais cedo o transplante renal seja realizado, maior será a sobrevida dos pacientes nefropatas. A realização do transplante preemptivo, antes mesmo da necessidade de diálise, melhora significativamente a sobrevida do enxerto e diminui o risco de rejeição crônica (DAVIS, 2010).

No presente estudo, 40% dos pacientes possuíam resultados negativos para PRA pré-transplante, 45,6% não tinham o resultado disponível, 6,3% não realizaram esse exame e apenas 8,1% dos pacientes tinham resultado positivo. A avaliação da presença de anticorpos contra um painel de células (PRA) ou antígenos HLA é uma forma rotineira de investigar a sensibilização prévia aos antígenos HLA. Os resultados informam o grau de imunização dos pacientes candidatos ao transplante renal e são expressos em percentual (TORESAN, 2007).

As causas mais comuns de sensibilização pré-transplante aos antígenos HLA são as transfusões sanguíneas, gestações e transplantes prévios. Mesmo com a prova cruzada negativa, os pacientes com PRA pré-transplante positivo possuem risco aumentado de rejeição, o que pode ser explicado pela ativação do sistema imune do receptor ou pela presença de anticorpos específicos do doador. A produção de anticorpos anti-HLA pelo receptor, após o transplante, também está associada à maior incidência e gravidade dos episódios de rejeição aguda, a curto prazo, e à menor sobrevida do enxerto, a longo prazo (KAUFMAN et al., 2005; TORESAN, 2007). Ferreira et al. (2011) relataram que o PRA pré-transplante positivo constituiu um fator de risco independente, três vezes maior, associado à perda do enxerto. Dessa forma, a pesquisa de PRA pré e pós-transplante constitui um parâmetro importante para monitorar a estabilidade do paciente transplantado e verificar a ocorrência de disfunção tardia do enxerto.

Cumprе ressaltar que no presente estudo não foram encontradas diferenças entre as frequências de PRA positivo entre homens (10,7%) e mulheres (3,6%). No entanto, 53,4% dos homens e 31,6% das mulheres não tinham resultado do PRA pré-transplante disponível em seus prontuários, o que comprometeu a análise comparativa deste parâmetro.

Em relação à terapia imunossupressora utilizada pelos pacientes incluídos neste estudo, os inibidores de calcineurina (tacrolimus ou ciclosporina), combinados com um antiproliferativo (MMF) e prednisona foram os mais comuns. Poucos pacientes (5%) utilizavam um inibidor da mTOR (sirolimus ou everolimus), 53,8% utilizavam tacrolimus e 30,6% utilizavam ciclosporina em terapias triplas (Tabela 1). Ferreira et al. (2011) revelaram que a imunossupressão por esquema triplo de drogas também foi mais frequente, sendo que 4% dos pacientes utilizavam sirolimus, 61,5% utilizavam tacrolimus e 38,5% utilizavam ciclosporina. De forma similar, um estudo conduzido nos Estados Unidos também revelou que o esquema triplo (tacrolimus, micofenolato mofetil e prednisona) foi o mais frequente entre os transplantados renais (BADOWSKI et al., 2009).

Além da terapia imunossupressora, 59,2% dos homens e 50,9% das mulheres utilizavam algum tipo de hipotensor, o que está de acordo com os dados encontrados para a causa primária mais frequente da DRC nos pacientes transplantados, a nefroesclerose hipertensiva. Um percentual similar de homens e mulheres utilizava ácido acetilsalicílico, estatinas/fibratos, suplementos/polivitamínicos e insulina/hipoglicemiantes orais. Um percentual maior de mulheres (19,3%) fazia uso de ansiolíticos/antidepressivos, comparando-se aos homens (10,7%), o que provavelmente reflete o impacto psicossocial da DRC e do transplante renal em mulheres (BARRETO & FIGUEIREDO, 2009).

## **6.2 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nos pacientes transplantados renais de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina**

A creatinina plasmática é frequentemente utilizada para estimar a função renal nos laboratórios clínicos. Este exame é rotineiramente solicitado no pós-transplante renal para monitorar os pacientes e detectar precocemente a existência de rejeição ao órgão transplantado. No entanto, Jung et al. (2012) alertaram que, em geral, não se detecta a disfunção renal até que os níveis plasmáticos de creatinina estejam bastante aumentados, o que falharia na prevenção da perda precoce do enxerto.

Fischreder & Schoepel, 2009 admitiram que o transplante renal constitui uma intervenção clínica capaz de desencadear uma resposta inflamatória e,

consequentemente, resultar em aumento da síntese de citocinas nos pacientes transplantados.

No presente estudo, a comparação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras nos três subgrupos de pacientes (C1:creatinina <1,4mg/dL; C2:1,4 a 2,0mg/dL e C3:>2,0mg/dL) não revelou diferenças. No entanto, houve uma tendência à elevação dos níveis de IL-6 no subgrupo C3 em relação ao C1 (Figura 8).

Estudos sugerem que a IL-6 possa ser um marcador inflamatório sensível para monitorar o pós-transplante renal. Dahle et al. (2011) sugeriram que a IL-6 é um marcador de alta sensibilidade para detectar precocemente a perda da função renal do enxerto, principalmente ao longo dos anos. Estes investigadores relataram também que quando os níveis plasmáticos de creatinina elevam ao dobro, os níveis de IL-6 tendem a elevar na mesma proporção. Sabe-se, também, que a diminuição do ritmo de filtração renal pode afetar os níveis de moléculas inflamatórias, pois tanto a IL-6, quanto a proteína C reativa (PCR) estão inversamente associadas à depuração de creatinina. Dessa forma, o declínio da função renal contribuiria para diminuir a depuração de substâncias pró-inflamatórias, que estão direta (pela alta produção) ou indiretamente (pela retenção renal) envolvidas na inflamação e na disfunção de células endoteliais encontradas em pacientes transplantados (ZBROCH et al., 2012).

Reinhold et al. (2012), revelaram níveis urinários elevados de IL-6 em pacientes com rejeição aguda a curto prazo após o transplante (duas semanas), assim como em pacientes que apresentaram rejeição cerca de 2 a 3 meses após o transplante. Estes investigadores propuseram que a IL-6 possui um bom valor preditivo positivo e poderia constituir uma ferramenta importante para o diagnóstico/monitoração do enxerto, se relacionada aos níveis plasmáticos crescentes de creatinina, especialmente a curto prazo. Diante desses relatos, é possível inferir que o valor de *p* *boderline* da significância estatística ( $p=0,058$ ) obtido, no presente estudo, para os níveis de IL-6 no subgrupo C3 (creatinina>2,0mg/dL) em relação ao C1 (creatinina<1,4mg/dL) seja devido ao baixo poder amostral.

Considerando a não observação de diferença nos níveis plasmáticos de citocinas, apesar da alteração dos níveis creatinina, uma nova estratégia de análise das citocinas nos pacientes transplantados renais foi feita, incluindo o estudo das

médias móveis de cada citocina (Figura 9), a determinação de pacientes altos e baixos produtores de citocinas (considerando a média global das citocinas como *cut off* - Figura 10), bem como a construção do diagrama de frequência (Figura 11), o que permitiu a definição das assinaturas de citocinas (Figuras 12 e 13).

A análise por assinatura de citocinas é um método qualitativo, observacional, não estatístico e não ortodoxo. Análises por assinatura vêm sendo cada vez mais utilizadas para interpretar resultados de parâmetros laboratoriais, para os quais não é possível estabelecer uma faixa de referência ou que têm produção localizada e estão sendo avaliados sistemicamente, como as citocinas (FREITAS-TEIXEIRA et al., 2012; GOMES et al., 2012; DE ALMEIDA et al., 2012; PECK & NGUYEN, 2012; STAUB, 2012). Assinatura de citocinas tem sido muito utilizada, também, para descrever o perfil de expressão ou de frequência de genes ou micro RNA na população em geral, bem como em condições patológicas específicas (LENG et al., 2012; BEDOLLA et al., 2012; ESCHRICH et al., 2012). É ainda utilizada para descrever o perfil de alterações metabólicas (CARO et al., 2012).

No presente estudo, a análise da média móvel de citocinas, em função dos níveis plasmáticos de creatinina, revelou um predomínio de citocinas reguladoras, principalmente IL-4 e IL-5, em pacientes com concentrações mais baixas de creatinina ( $<1,6\text{mg/dL}$ ), enquanto que níveis mais elevados da citocina pró-inflamatória IL-8 foram associados com a elevação concomitante da concentração plasmática de creatinina, como mostra a figura 9. De fato, a análise de frequência de pacientes baixos e altos produtores de citocinas revelou que nos subgrupos C2 (creatinina entre 1,4 e 2,0mg/dL) e C3 (creatinina  $>2,0\text{mg/dL}$ ) havia uma maior frequência de elevação de citocinas pró-inflamatórias, embora os pacientes do C3 também apresentassem elevações de IL-4, IL-5 e IL-10, como mostra a figura 11.

O subgrupo C3 apresentou um perfil equilibrado de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, o que permite inferir uma possível ativação da produção de citocinas reguladoras, quando as concentrações de creatinina estão elevadas ( $>2,0\text{mg/dL}$ ), sugerindo um papel antagonista dessas às citocinas pró-inflamatórias. No entanto, a análise multivariada, que será discutida no item 6.6, revelou que nenhuma citocina manteve-se associada, de forma independente, à função renal, o que sugere o caráter multifatorial da condição clínica pós-transplante. Reinhold et al. (2012) e Newell; Phippard & Turka (2011) admitiram que a relação entre os níveis plasmáticos de citocinas e de creatinina no pós-transplante renal ainda não está

totalmente esclarecida, mas acreditam que o processo imunorregulador favoreça a aceitação do enxerto, com redução dos níveis plasmáticos de citocinas pró-inflamatórias.

### **6.3 Avaliação dos parâmetros hemostáticos nos pacientes transplantados renais de acordo com os níveis plasmáticos de creatinina**

As alterações hemostáticas que ocorrem após o transplante renal ainda não são totalmente conhecidas. A ativação da coagulação sanguínea, a supressão do sistema fibrinolítico, o desenvolvimento da aterosclerose e da hipertensão arterial tem sido descritos em pacientes transplantados renais (HRYSZKO et al., 2001; MALYSZKO et al., 2006a).

A avaliação da hemostasia nos pacientes transplantados renais incluiu a determinação dos níveis plasmáticos de quatro marcadores, D-Di, TM, ADAMTS13 e FvW. Os resultados revelaram um aumento significativo de D-Di no subgrupo C3 (creatinina >2,0mg/dL) quando comparado ao C1 (creatinina <1,4mg/dL). Além disso, foi observada uma tendência à elevação de D-Di nos subgrupos, sendo  $C1 < C2 < C3$ , o que sugere que a disfunção renal, associada à elevação de creatinina, por si só, poderia favorecer o estado pró-trombótico.

Pawlicki et al. (2007) relataram um aumento significativo de D-Di nos dias 7 e 14 pós-transplante, comparando-se com os níveis antes do transplante. De forma semelhante, Levitsky et al. (2009) relataram um aumento dos níveis plasmáticos de D-Di no grupo de pacientes transplantados renais em relação ao pré-transplante, principalmente no pós-transplante imediato, mas que regrediu com a estabilização da função renal e dos níveis plasmáticos de creatinina. Estes pesquisadores também afirmaram que a coagulação pode permanecer ativada em pacientes transplantados, principalmente devido à inflamação. Um levantamento da literatura, entretanto, revelou poucos estudos associando a função renal, os níveis plasmáticos de creatinina e os níveis plasmáticos de D-Di, bem como outros marcadores hemostáticos (AKIYAMA et al., 1991; FIORINA et al., 2003; RAMPINO et al., 2004; PAWLICKI et al., 2011; DUBIN et al., 2011)

A quebra do coágulo de fibrina pela plasmina resulta em vários fragmentos relativamente estáveis e o menor desses é o D-Di. Este fragmento é resistente à degradação de plasmina e o aumento dos seus níveis plasmáticos reflete tanto a

polimerização, quanto a degradação da fibrina (TRIPODI, 2011). A elevação dos níveis plasmáticos de D-Di também pode ser consequente à diminuição do seu *clearance* urinário, pois o D-Di possui peso molecular elevado e, portanto, não é perdido na urina em sua forma intacta (AKIYAMA et al., 1991; DUBIN et al., 2011). Akiyama et al. (1991) propuseram que a detecção de fragmentos de D-Di na urina pode ser utilizada como um método auxiliar da reversibilidade da rejeição aguda em pacientes transplantados renais e que quanto maior for o *clearance* desses fragmentos, maior será a chance de recuperação da função renal.

Sabe-se que as doenças microvasculares, frequentemente associadas à DRC e ao transplante renal, podem resultar na formação aumentada de fibrina e, conseqüentemente, na elevação dos níveis plasmáticos de D-Di e, nesse caso, o aumento de D-Di não seria nem causa nem efeito da diminuição da função renal. Considerando que, no presente estudo, as frequências de nefrosclerose hipertensiva e nefropatia diabética foram maiores nos pacientes do subgrupo C3 (C3=55% > C2=46,6% > C1=41,8%), pode-se inferir que as doenças microvasculares pré-existentes nos pacientes transplantados renais, associadas à hipertensão e ao diabetes, possam ter também contribuído para o aumento de D-Di no subgrupo C3.

Com relação à TM, embora não tenha sido observada diferença entre as medianas dos subgrupos (C1=6,12; C2=6,76 e C3=7,02ng/mL) essas estavam acima do intervalo de referência (4,00 a 5,35ng/mL). A TM é um marcador de lesão endotelial e está presente nas células endoteliais de todo o território vascular, exceto na microcirculação do cérebro (WALKER, FAY; 1992). A avaliação da lesão endotelial em transplantados renais e em outras condições clínicas é bastante complexa, devido à natureza múltipla da mesma. Em concordância com os resultados do presente estudo, um aumento de TM após o transplante renal foi relatado previamente por diversos pesquisadores (MALYSZKO et al., 2003; MALYSZKO et al., 2006; MALYSZKO et al., 2008; HRYSZKO et al., 2001; KAVANAGH & GOODSHIP, 2010; ZBROCH et al., 2012).

Sabe-se que a TM tem um papel essencial na via da proteína C, um anticoagulante natural que constitui um elo importante entre a coagulação e a inflamação. Além da célula endotelial, células do músculo liso, plaquetas, monócitos e cardiomiócitos também expressam TM. Recentemente a TM foi encontrada em

células tumorais, sugerindo que sua função biológica não está restrita apenas à anticoagulação natural (HENG LI et al., 2012).

No presente estudo, as medianas de ADAMTS13 não diferiram nos três subgrupos (C1=544,3; C2=547,6 e C3=576,3ng/mL), no entanto, estavam abaixo do intervalo de referência (630 a 860ng/mL). A enzima ADAMTS13 normalmente circula no plasma e tem peso molecular elevado, de aproximadamente 150-190kDa. Recentemente, Manea et al., 2010 detectaram RNA mensageiro de ADAMTS13 no rim, especialmente nas células endoteliais glomerulares, células endoteliais tubulares, podócitos e membrana glomerular. Embora a síntese de ADAMTS13 tenha sido primeiramente descrita no fígado (UEMURA et al., 2005), essa também foi detectada nas plaquetas (SUZUKI et al., 2004) e posteriormente nas células endoteliais (SHANG et al., 2006).

A ADAMTS13 foi identificada na urina de pacientes com lesão tubular, mas não na urina de indivíduos saudáveis. Além disso, foi detectada difusamente no córtex renal e túbulos do tecido renal normal e seu acúmulo foi visto, por imunohistoquímica, em células apicais do tecido renal de pacientes com lesão tubular. Foi demonstrado que as células tubulares sintetizam ADAMTS13 biologicamente ativa. Em função do peso molecular elevado, não é esperado que ADAMTS13 seja filtrada para a urina em indivíduos com glomérulo saudável. A presença de ADAMTS13 na urina de pacientes com lesão tubular sugere que essa enzima tenha origem nas células tubulares que a secretam ou que seja proveniente da lesão glomerular extensa, permitindo a passagem de macromoléculas (MANEA et al., 2010).

As médias de FvW para os três subgrupos (C1=796,0; C2=757,9 C3=770,2mU/mL) estavam dentro do intervalo de referência (683,0 a 1012,0mU/mL). Como a mediana de ADAMTS13, avaliada nos pacientes deste estudo, estava abaixo da faixa de referência e de TM acima (sugerindo lesão endotelial), seria esperado um aumento da média de FvW, uma vez que esse fator é sintetizado pelas células endoteliais e é clivado pela ADAMTS13. No entanto, este aumento não foi obtido. Lu et al., 2008 relataram que o tratamento com corticoesteroides ou micofenolato mofetil reduziu os níveis de FvW em pacientes com nefrite lúpica, sugerindo que esses imunossupressores melhoram a função endotelial. No presente estudo, todos os pacientes utilizavam pelo um desses medicamentos, o que pode ter contribuído para manutenção da média de FvW dentro do intervalo de referência. A

obtenção de mediana de TM acima da faixa de referência (apesar da melhora da função endotelial admitida com o uso de corticoesteroides ou micofenolato mofetil) poderia ser explicada pelo uso concomitante de ciclosporina pelos pacientes, uma vez que foi demonstrado em cultura de células, uma elevação dos níveis de TM solúvel após a adição de ciclosporina ao meio (SEKI et al., 2005).

Contrariamente aos resultados obtidos no presente estudo, um aumento dos níveis de FvW em pacientes transplantados renais com função estável, associado à piora da função renal foi anteriormente relatado (MALYSZKO et al., 2008; ZBROCH et al., 2012). Cumpre ressaltar que ambos estudos incluíram um número maior de pacientes hipertensos que no presente estudo, o que poderia explicar a divergência com relação aos níveis de FvW.

Quatro pacientes incluídos no presente estudo tiveram os níveis de FvW e ADAMTS13 determinados também antes do transplante renal. Os níveis de ADAMTS13 aumentaram após o transplante em todos os casos (386 para 757; 391 para 534; 277 para 679 e 185 para 450ng/mL), enquanto os níveis de FvW reduziram em dois casos (1032 para 779 e 1510 para 592mU/mL) e elevaram em dois casos (613 para 794 e 519 para 892Um/mL) (RIOS et al., 2011).

Uma revisão da literatura revelou que poucos estudos avaliaram os níveis de ADAMTS13 e de FvW em pacientes transplantados renais. Lu et al. (2008) relataram que a atividade da ADAMTS13 não foi diferente antes do transplante ou uma e duas semanas após. Estes pesquisadores sugeriram que os níveis de ADAMTS13 deveriam ser investigados ao longo do tempo pós-transplante para esclarecer a participação dessa enzima na aceitação ou rejeição ao enxerto.

#### **6.4 Avaliação dos parâmetros inflamatórios nos pacientes transplantados renais em função do tempo pós-transplante**

A análise do perfil de citocinas de 120 pacientes transplantados renais distribuídos em quatro subgrupos, de acordo com o tempo pós-transplante renal (T1=1-24 meses, T2=25-60 meses, T3=61-120 meses e T4=>120 meses) revelou que no subgrupo T1 houve um predomínio de citocinas reguladoras, enquanto no subgrupo 4, prevaleceram as citocinas pró-inflamatórias (Figura 15). Cumpre ressaltar que dos 39 pacientes integrantes do subgrupo T4, apenas sete tinham mais de 180 meses pós-transplante.

A comparação estatística dos níveis de citocinas nos quatro subgrupos revelou um aumento significativo de IL-5 no T1, o que sugere que essa citocina pode constituir um biomarcador da regulação imunológica na função renal pós-transplante a curto prazo (Figura 19). Embora o envolvimento de IL-5 e outras citocinas reguladoras no mecanismo de tolerância imunológica não esteja totalmente esclarecido, admite-se que níveis elevados de IL-5 no pós-transplante recente, principalmente no primeiro ano, refletem a terapia imunossupressora de indução da tolerância, que é utilizada especialmente nesse período (KAWAI & COSIMI, 2010).

A tolerância ao transplante é considerada uma adaptação do sistema imune do receptor ao reconhecimento de aloantígenos do doador, com controle da auto reatividade. A indução da tolerância imunológica constitui uma das metas principais para o sucesso dos transplantes (SAKAGUCHI, WING, YAMAGUCHI, 2009; KAWAI & COSIMI, 2010). O mecanismo de desenvolvimento da tolerância imunológica depende, em parte, da terapia imunossupressora, mas também é mediado pela resposta imune celular e pela atividade das citocinas. O equilíbrio entre citocinas reguladoras e pró-inflamatórias desempenha um papel crucial no controle da tolerância (PLAIN et al., 2007). Diversos estudos relataram que após o transplante renal, alterações no perfil sistêmico de citocinas são observadas nas primeiras 6-24 horas após a cirurgia e são determinantes da resposta imune para a rejeição ou tolerância ao enxerto (MANZANO et al., 2005; KARCZEWSKI et al., 2009; PARK et al., 2010).

As citocinas pró-inflamatórias, como a IL-2 e a IL-15, medeiam o processo de rejeição, enquanto as citocinas reguladoras, como o TGF- $\beta$  e a IL-10 participam dos mecanismos de tolerância imunológica. Este equilíbrio é fundamental para a falha ou sucesso do enxerto renal, principalmente no primeiro ano pós-transplante (MANZANO et al., 2005; KARCZEWSKI et al., 2009; PEREIRA et al., 2009).

No presente estudo, não houve predomínio de citocinas pró-inflamatórias no subgrupo T1 (1-24 meses pós-transplante). Em concordância, dois estudos detectaram apenas um grau leve de inflamação e uma fibrose intersticial discreta no enxerto foram observados na análise histológica de biópsias protocolares, nos dois primeiros anos pós-transplante bem sucedido (COTTONE et al., 2007; PARK et al., 2010).

Uma tendência discreta ao aumento de TNF- $\alpha$  foi observada no subgrupo T2 (25-60 meses pós-transplante). Após dois anos da realização do transplante, a dose

de imunossupressores é usualmente reduzida, o que justificaria a diminuição de citocinas reguladoras e a mudança para um perfil pró-inflamatório. Cottone et al., 2007 avaliaram os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  de pacientes com 5 $\pm$ 3 anos pós-transplante renal e revelaram níveis mais elevados dessa citocina, comparando-se aos controles. No subgrupo T3 (61-120 meses pós-transplante) não foram observadas tendências à elevação de nenhuma das citocinas avaliadas. No entanto, no subgrupo T4 (>120 meses pós-transplante), foi obtida uma tendência à elevação das citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, IL1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  IL-12).

Os níveis plasmáticos de IL-12 foram significativamente maiores no subgrupo T4 em relação ao T1 (Figura 19). As alterações no protocolo de tratamento imunossupressor poderiam justificar os resultados obtidos, pois sabe-se que as drogas imunossupressoras tanto podem estimular a produção direta de IL-12 (por mecanismos nefrotóxicos), quanto diminuir a produção de seus supressores. Outra provável explicação para a elevação dos níveis de IL-12 no T4 é o desenvolvimento de inflamação e fibrose intersticial a longo prazo. É esperado que a partir de cinco anos após o transplante a maioria dos pacientes apresente algum grau de inflamação e fibrose. No entanto, o grau da glomerulopatia é bastante variável em cada paciente e as alterações específicas só poderiam ser detectadas por biópsia protocolares e análise histológica do tecido renal (COSIO et al., 2005; PARK et al., 2010).

Daniel et al., 2005 propuseram que a dose do imunossupressor poderia afetar diretamente o equilíbrio entre as citocinas reguladoras e pró-inflamatórias, com baixa regulação das primeiras e predomínio das segundas, por exemplo, redução de IL-10 e aumento de IL-12 a longo prazo pós-transplante. No entanto, no presente estudo, não foram encontradas diferenças para os níveis plasmáticos de IL-10 comparando-se os quatro subgrupos avaliados.

Estudos recentes têm demonstrado que a regulação negativa de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12, está associada com a tolerância imunológica ao enxerto renal a curto e longo prazo. Por outro lado, o aumento de citocinas pró-inflamatórias pode estar associado à diminuição da função renal ou disfunção tardia do enxerto, especialmente a longo prazo (PLAIN et al., 2007; VUILLEFROY DE SILLY et al., 2012).

Diversos estudos já foram conduzidos no sentido de avaliar os níveis plasmáticos de citocinas a curto prazo pós-transplante (DILLER et al., 2003; COSIO

et al., 2005; DANIEL et al., 2005; JIMENEZ et al., 2005; KARCZEWSKI et al., 2008; KARCKZEWSKI et al., 2009; PARK et al., 2010). No entanto, poucos estudos foram encontrados avaliando o perfil de citocinas por um longo período ( $\pm 5$  anos) após o transplante renal (DANIEL et al., 2005; ABEDINI et al., 2009; DE SERRES et al., 2011). Certamente, a compreensão da resposta imune a curto e a longo prazo após o transplante renal irá fornecer subsídios para esclarecer os mecanismos de tolerância imunológica e o processo de rejeição ao enxerto.

No presente estudo, a análise comparativa das assinaturas de citocinas revelou que no curto prazo pós-transplante (subgrupo T1) houve uma frequência maior de pacientes com níveis elevados de IL-4, IL-5 e IL-10, enquanto no prazo intermediário (subgrupo T3), houve maior frequência de pacientes com níveis elevados de IL-8 e IL-10, mostrando um balanço entre essas citocinas. É possível inferir que os pacientes com mais de cinco anos pós-transplante tenham alcançado um certo equilíbrio entre a resposta reguladora e inflamatória. Entretanto é esperado que este equilíbrio seja reduzido com o envelhecimento do enxerto, associado principalmente à produção de anticorpos anti-HLA (CAI & TERASAKI, 2008). De fato, a assinatura de citocinas a longo prazo (subgrupo T4) revelou um predomínio de citocinas pró-inflamatórias em mais de 50% dos pacientes avaliados.

Em um estudo recente, De Serres et al. (2011) demonstraram que a glomerulopatia encontrada a longo prazo em pacientes transplantados renais (5-14 anos pós-transplante) estava associada a níveis plasmáticos mais elevados de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ . É importante salientar que a longo prazo após o transplante renal, além do envelhecimento do paciente e do enxerto, ocorre, com frequência, um descuido com a terapia farmacológica e com as restrições impostas pela condição de indivíduo transplantado. Isto se deve ao fato do indivíduo sentir-se bem, com a função renal estável por um longo período e essa menor preocupação com os cuidados da saúde poderia ativar a resposta inflamatória em detrimento da reguladora.

### **6.5 Avaliação dos parâmetros hemostáticos nos pacientes transplantados renais em função do tempo pós-transplante**

No presente estudo, não foram observadas diferenças significativas entre os níveis dos parâmetros hemostáticos avaliados (D-Di, TM, FvW e ADAMTS13) nos

subgrupos T1, T2, T3 e T4. No entanto, houve uma tendência à elevação de D-Di no subgrupo T4 (>120 meses pós-transplante) em relação aos demais subgrupos.

Um levantamento dos estudos da literatura revelou que maioria desses avalia os marcadores hemostáticos apenas a curto prazo após o transplante renal. Um estudo recente demonstrou a elevação dos níveis plasmáticos de D-Di no pós-operatório imediato (7 e 14 dias após o transplante renal), o que é esperado no período pós-cirúrgico (PAWLICK et al., 2011). Levitsky et al., 2009 relataram que a microangiopatia trombótica, infecção por citomegalovírus e outras complicações que podem surgir no pós-transplante, estão associadas à elevação de D-Di e à rejeição do enxerto.

Cumprе ressaltar que no presente estudo mais de 30% dos pacientes faziam uso de ciclosporina e sabe-se que um dos efeitos indesejáveis desse imunossupressor é sua potencial ação pró-trombótica (IRISH, 2004; TURUNEN et al., 2008; LEVITSKY et al., 2009). Ballow et al., 2007 relataram níveis significativamente elevados de D-Di em pacientes sob hemodiálise e transplantados renais. No entanto, estes pesquisadores sugeriram que as alterações hemostáticas associadas à DRC podem ser corrigidas após um transplante renal bem sucedido.

## **6.6 Análise uni e multivariada dos parâmetros inflamatórios, hemostáticos e clínicos em função dos níveis plasmáticos de creatinina e do eRFG**

Considerando as limitações da determinação da creatinina plasmática para avaliar a função renal, o eRFG calculado pela fórmula MDRD simplificada foi também utilizado para as análise uni e multivariadas.

Sabe-se que os níveis de creatinina são diretamente proporcionais à massa muscular, que varia de acordo com a idade, sexo e etnia e são também alterados nas condições que causam perda muscular. A creatinina é livremente filtrada pelo glomérulo e não é reabsorvida nem metabolizada pelo rim. Entretanto, aproximadamente 10% a 40% da creatinina urinária é proveniente da secreção tubular de cátions orgânicos no túbulo proximal, sendo mais significativa quanto menor estiver a taxa de filtração glomerular. A quantidade secretada não é constante e depende do indivíduo e da concentração sérica de creatinina, dificultando

sobremaneira a determinação de uma constante de secreção (BURTIS; ASHWOOD & BRUNS, 2008).

A análise univariada de regressão multinomial revelou uma associação significativa entre os níveis de creatinina ( $>2\text{mg/dL}$ ) e o tempo pós-transplante e os parâmetros hemostáticos (TM, D-Di). O sexo, a idade, as citocinas (IFN- $\gamma$ , IL-5 e IL-10) e os parâmetros hemostáticos (ADAMTS13 e FvW), apresentaram  $p < 0,20$  e foram incluídos na análise multivariada.

Após o ajuste na análise de regressão multinomial multivariada, apenas a ADAMTS13 permaneceu associada positivamente aos níveis plasmáticos de creatinina. No presente estudo, de fato a mediana de ADAMTS13 foi maior no subgrupo C3 (creatinina  $>2,0\text{mg/dL}$ ) em relação ao C1 ( $<1,4\text{mg/dL}$ ) e C2 ( $1,4-2,0\text{mg/dL}$ ), sugerindo que no subgrupo C3 a capacidade de filtração renal possa estar comprometida, o que poderia acarretar prejuízo ao *clearance* da ADAMTS13.

A análise univariada de regressão logística mostrou uma associação entre sexo e D-Di *versus* eRFG ( $p < 0,05$ ). Esta análise revelou, também, uma possível associação entre tempo pós-transplante, tempo de hemodiálise, IL-6, TM e ADAMTS13 *versus* eRFG ( $p < 0,20$ ).

Na análise de regressão logística multivariada, o sexo feminino, o subgrupo T3 e o D-Di permaneceram associados independentemente ao eRFG. Os menores valores de eRFG foram associados ao sexo feminino, ao subgrupo T3 e à elevação de D-Di. De fato, o prognóstico das doenças renais nas mulheres é pior que nos homens (CARRERO, 2010). As evidências clínicas sugerem que o período de 5 a 10 anos após o transplante é crucial, pois a imunossupressão é gradativamente reduzida ao longo dos anos e, nos casos em que há rejeição, essa já está exacerbando. Dessa forma, os pacientes que ultrapassaram o período 10 anos após o transplante (subgrupo T4) são aqueles que aceitaram bem o enxerto e estão numa condição imunológica melhor que aqueles com 5 a 10 anos (subgrupo T3), o que justificaria a associação do T3 ao comprometimento do eRFG. Até o quinto ano pós-transplante, além da imunossupressão ser mais intensa, o processo de rejeição ao enxerto, se iniciado, ainda está em fase de instalação, o que não comprometeria o eRFG. Os resultados deste estudo mostraram que os níveis de D-Di foram maiores no subgrupo C3 em relação ao C1 ( $p = 0,002$ ) e houve uma tendência à elevação desse marcador nos subgrupos ( $C1 < C2 < C3$ ), o que justifica a associação encontrada com o eRFG.

## *7 CONCLUSÕES*

## 7 CONCLUSÕES

O D-Di foi o marcador mais promissor para estimar a função renal, uma vez que foi elevado no subgrupo com maiores níveis de creatinina e associado à redução do ritmo de filtração glomerular.

A regulação da inflamação a curto prazo foi mediada principalmente pela IL-5.

A resposta pró-inflamatória a longo prazo foi mediada principalmente pela IL-12.

A ADAMTS13 mostrou-se promissora para estimar a função renal.

O sexo feminino e o tempo pós-transplante “61 a 120 meses” foram associados ao comprometimento do ritmo de filtração glomerular.

## *8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO*

## 8 LIMITAÇÕES DO ESTUDO

O desenho transversal do presente estudo pode oferecer restrições para definir a relação causal entre os achados imunológicos, hemostáticos e clínicos. Entretanto, deve ser enfatizado que os estudos transversais são relevantes para fornecer informações e guiar a realização de estudos prospectivos/longitudinais.

A seleção de pacientes com função renal estável impossibilita, em parte, as comparações das influências exercidas pelos marcadores inflamatórios e hemostáticos no pós-transplante renal.

A proteinúria não foi avaliada nos pacientes do presente estudo, pois muitos não realizaram o exame nas proximidades da coleta ou não possuíam o dado disponível em seus prontuários. A análise da proteinúria seria interessante, pois a albumina é uma proteína de baixo peso, normalmente filtrada e reabsorvida por células tubulares saudáveis. A presença de proteinúria em pacientes com tubulopatia é um indicativo de defeito na reabsorção tubular ou aumento da permeabilidade glomerular às macromoléculas. A proteinúria poderia ser associada aos parâmetros inflamatórios e hemostáticos avaliados.

A ausência de rejeição não foi confirmada por biópsia dos rins e análise histológica.

## *9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO*

## **9 PERSPECTIVAS DE ESTUDO**

Determinar os níveis plasmáticos de D-Di em pacientes com rejeição e compará-los aos pacientes com função renal estável.

Determinar os níveis plasmáticos de D-Di ao longo dos anos (estudo longitudinal) dando seguimento à avaliação clínica e laboratorial dos pacientes do presente estudo.

Avaliar os principais desfechos clínicos relacionados aos pacientes transplantados renais do presente estudo.

## *REFERÊNCIAS*

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Básica – Funções e Distúrbios do Sistema Imunológico**. 2. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007. 354p.

ABEDINI, S. HOLME, I. et al. Inflammation in Renal Transplantation. **Clinical Journal Am Soc Nephrology**, v.4, p.1246–1254, 2009.

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n.4, p.01-48, jan-dez, 2010.

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n.4, p.01-19, jan-dez, 2011.

ABTO – Associação Brasileira de Transplante de Órgãos. **Registro Brasileiro de Transplantes**, n.2, p.01-21, jan-jun, 2012.

ADAM, S.S.; KEY, N.S.; GREENBERG, C.S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. **Blood**, v.113, n.13, p.2878-2887, 2009.

AIRD, W.C. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium I. Structure, Function, and Mechanisms. **Circ Res.**, v.100:158-173, 2007(a).

AIRD, W.C. Phenotypic Heterogeneity of the Endothelium II. Representative Vascular Beds. **Circ Res.**, v.100:174-190, 2007(b).

AIRD, W.C. Endothelium in health and disease. **Pharmacological Reports**, 2008, v.60:139-143.

AIRES, M. M. et al. **Fisiologia**. 3. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, v.1, 1232p.

AKDIS et al. Interleukins, from 1 to 37, and interferon-g: Receptors, functions, and roles in diseases. **J Allergy Clin Immunol**, 2011, 127(3): 721-812.

AKIYAMA, T.; IKEGAMI, M.; UEMURA, T. et al. Urinary tissue-type plasminogen activator (tPA) in renal transplant patients. **Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi.**, 1991, 82(4):565-71 [ABSTRACT].

AMERICAN HEART ASSOCIATION. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease. **Circulation**, 2003; v.108: p.2154-69.

ANGIOLILLO, D.J.; UENO, M.; GOTO, S. Basic principles of platelet biology and clinical implications. **Circulation Journal**, v.74, n.4, p.597-607, 2010.

BADOWSKI, M.; GURK-TURNER, C.; CANGRO, C. The impact of reduced immunosuppression on graft outcomes in elderly renal transplant recipients. **Clin Transplant** 2009; 23: 930–937

BALLOW, A.; GADER, A.M.; HURAIB, S. et al. Successful kidney transplantation does not reverse the coagulopathy in patients with chronic renal failure on either hemo or peritoneal dialysis. **Saudi Journal of Kidney Diseases Transplantation**, 2007, Jun;18(2):177-85.

BARRETO, S. M.; FIGUEIREDO, R. C. Doença crônica, auto-avaliação de saúde e comportamento de risco: diferença de gênero. **Rev Saúde Pública** 2009;43(Supl 2):38-47

BARRETO, D.V.; BARRETO, F.C.; LIABEU, S.; TEMMAR, M.; LEMKE, H.D et al. Plasma interleukin-6 is independently associated with mortality in both hemodialysis and pre-dialysis patients with chronic kidney disease. **Kidney International**, v.77, p.550-56, 2010.

BARROS, E.; MANFRO, R. C.; THOMÉ, F. S.; GONÇALVES, L. F. S. **Nefrologia: rotinas, diagnóstico e tratamento**. 3. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 619p.

BASIĆ-JUKIĆ, N.; JURIĆ, I.; KES, P. et al. Arterial hypertension in renal transplant recipients. **Acta Med Croatica**, 2007, Apr;61(2):171-6. [Abstract]

BASTOS, M. G. et al. Fatores de Risco Para o Desenvolvimento de Diabetes Mellitus Pós-Transplante Renal. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol 49 nº 2 Abril 2005

BASTOS, M. G.; KIRSZTAJN, G. M. Doença renal crônica: importância do diagnóstico precoce, encaminhamento imediato e abordagem interdisciplinar estruturada para melhora do desfecho em pacientes ainda não submetidos à diálise. **J Bras Nefrol** 2011;33(1): 93-108

BEDOLLA RG, GONG J, PRIHODA TJ et al. Predictive Value of Sp1/Sp3/FLIP Signature for Prostate Cancer Recurrence. **PLoS One**. 2012;7(9):e44917.

BENNETT, W.M. Transplantation Medical and immunosuppressive management. **ASN Board Review**, 2006.

BENZ, K.; CAMPEAN, V.; CORDASIC, N. et al. Early glomerular alterations in genetically determined low nephron number. **Am J Physiol Renal Physiol**, 300:F521-F530, 2011.

BERTONI E., ROSATI A., LARTI A., et al. Chronic kidney disease is still present after renal transplantation with excellent function. **Transplant Proc.**, 2006, 38(4):1024-5.

BOUCHER, D.; GOGUSEV, J.; DROZ, D. Expression of IL6 and TNF-alpha in normal and pathological kidney. **Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de ses Filiales**, 1993; 187(4):425-33. [Abstract]

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Sistema Nacional de Transplantes: Manual do Transplante Renal** e Lei nº 9.434/97, 2010. Disponíveis em <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/cidadao> e <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/area>. Acesso em 31/08/2010.

BRINKMANN, V.; BILLICH, A.; BAUMRUKER, T. et al. Fingolimod (FTY720): discovery and development of an oral drug to treat multiple sclerosis. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2010, 9:883-897.

BRÖCKER, V., SCHUBERT, V., SCHEFFNER, I. Arteriolar lesions in renal transplant biopsies: prevalence, progression, and clinical significance. **Am J Pathol.** 2012, 180(5):1852-62. [ABSTRACT]

BROMBERG, J.S. IL-10 immunosuppression in transplantation. **Current Opinion in Immunology**, 1995, 7:639-643.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. **Tietz – Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 959p.

CAI, J.; TERASAKI, P.I. Post-transplantation antibody monitoring and HLA antibody epitope identification. **Current Opinion in Immunology**, 2008, 20:602–606.

CARDONI et al. Citoquinas reguladoras de la respuesta al trasplante renal alogénico. **Medicina (Buenos Aires)**, 2005, 65: 54-62.

CARO P, KISHAN AU, NORBERG E, STANLEY IA et al. Metabolic signatures uncover distinct targets in molecular subsets of diffuse large B cell lymphoma. **Cancer Cell.** 2012 Oct 16;22(4):547-60

CARRERO, J. J. Gender Differences in Chronic Kidney Disease: Underpinnings and Therapeutic Implications. **Kidney Blood Press Res** 2010;33:383–392

CASTRO M., CAIUBY A.V.S., DRAIBE S.A, et al. Qualidade de vida de pacientes com insuficiência renal crônica em hemodiálise avaliada através do instrumento genérico SF-36. **Rev Assoc Med Bras.** 2003;49:245-9.

CÉSAR; SEZAR, CALDINI. **Biologia volume único**. 5. Ed. São Paulo: Saraiva, 2011. 816p.

COLVIN, B.T. Physiology of haemostasis. **Vox Sanguinis**, 2004, vol. 87(1), p. 43-46.

COLVIN, R.B. Pathology of chronic humoral rejection. **Contributions to Nephrology**, v.162, p.75-86, 2009.

CONTRERAS, A.G. et al. mTOR—Understanding the Clinical Effects. **Transplantation Proceedings**, 40, S9–S12, 2008.

COOPER, J.E.; WISEMAN, A.C. Novel immunosuppressive agents in kidney transplantation. **Clinical Nephrology**, v.73, n.5, p.333-43, 2010.

COSIO FG, GRANDE JP, WADEI H, et al. Predicting subsequent decline in kidney allograft function from early surveillance biopsies. **Am J Transplant.** 2005 Oct;5(10):2464-72.

COTTONES, PALERMO A, VACCARO F, et al. Inflammation and endothelial activation are linked to renal function in long-term kidney transplantation. **Transpl Int.** 2007 Jan;20(1):82-7.

D'ALESSIO, S.; GENUA, M.; VETRANO, S. The protein C pathway in intestinal barrier function: challenging the hemostasis paradigm. **Ann N Y Acad Sci.**, 2012, Jul;1258:78-85.

DAHLE DO, MJØEN G, OQVIST B et al. Inflammation-associated graft loss in renal transplant recipients. **Nephrol Dial Transplant.** 2011 Nov;26(11):3756-61.

DANIEL, V. et al. Association of Circulating Interleukin (IL)-12– and IL-10–Producing Dendritic Cells with Time Posttransplant, Dose of Immunosuppression, and Plasma Cytokines in Renal-Transplant Recipients. **Transplantation**, 2005;79: 1498–1506.

DAVIS, C.L. Preemptive transplantation and the transplant first initiative. **Curr Opin Nephrol Hypertens.**, 2010, Nov;19(6):592-7.

De ALMEIDA CM, De LIMA TA, CASTRO DB, et al. Immunological/virological peripheral blood biomarkers and distinct patterns of sleeping quality in chronic hepatitis C patients. **Scand J Immunol.** 2011 May;73(5):486-95.

De SERRES SA et al. Monocyte-secreted inflammatory cytokines are associated with transplant glomerulopathy in renal allograft recipients. **Transplantation**, 2011, 91(5):552-9.

DILLER, R. et al. Interleukin-6, Interleukin-8, and Interleukin-10 in Kidney Transplantation: Improved Risk Strategy? **Transplantation Proceedings**, 35, 1333-1337, 2003.

DOROSZEWSKI W., WŁODARCZYK Z., STRÓZECKI P. et al. Assessment of plasminogen activator inhibitor-1 and von Willebrand factor as a markers of endothelial function in patients with end-stage kidney disease after allotransplantation during a one-year follow-up. **Pol Arch Med Wewn.**, 2007, 117(5-6):213-20 [Abstract].

DUBIN R, CUSHMAN M, FOLSOM AR et al. Kidney function and multiple hemostatic markers: cross sectional associations in the multi-ethnic study of atherosclerosis. **BMC Nephrol.** 2011 Jan 26;12:3.

DUBOIS, V.; PERRAT, G.; ASSAQA, A. et al. Benefits of new methods for detection of anti-HLA class I antibodies. **Transplant Proc.**, 2002, 34(3):847-9.

ESCHRICH SA, FULP WJ, PAWITAN Y et al. Validation of a Radiosensitivity Molecular Signature in Breast Cancer. **Clin Cancer Res.** 2012 Sep 15;18(18):5134-5143.

FINK, H.A. et al. Screening for, Monitoring, and Treatment of Chronic Kidney Disease

Stages 1 to 3: A Systematic Review for the U.S. Preventive Services Task Force and for an American College of Physicians Clinical Practice Guideline. **Ann Intern Med.**, 2012;156:570-581.

FERREIRA, G.F.; MARQUES, I.D.B.; PARK, C.H.L. Análise de 10 anos de seguimento de transplantes renais com doador vivo não aparentado. **J. Bras.Nefrol.**, 2011, 33(3): 345-50.

FIORINA P., FOLLI F., BERTUZZI F. et al. Long-term beneficial effect of islet transplantation on diabetic macro-/microangiopathy in type 1 diabetic kidney-transplanted patients. **Diabetes Care.** 2003 Apr;26(4):1129-36.

FLISER, D. Perspectives in renal disease progression: the endothelium as a treatment target in chronic kidney disease **J NEPHROL**, 2010, 23(04): 369-376.

FREITAS-TEIXEIRA PM, SILVEIRA-LEMOS D, GIUNCHETTI RC et al. Distinct Pattern of Immunophenotypic Features of Innate and Adaptive Immunity as a Putative Signature of Clinical and Laboratorial Status of Patients with Localized Cutaneous Leishmaniasis. **Scand J Immunol.** 2012 Oct;76(4):421-432.

GALLIFORD, J.; GAME, D. S. Modern renal transplantation: present challenges and future prospects. **Postgraduate Medical Journal**, 85: 91–101, 2009.

GANDOLFO M.T., VERZOLA D., SALVATORE F. et al. Gender and the progression of chronic renal diseases: does apoptosis make the difference? **Minerva Urol Nefrol.**, 2004, 56(1):1-14.

GARCIA, V. **Transplante de Órgãos e Tecidos**. 2. ed. Ed. Segmento Farma, São Paulo, SP. 2006.

GOMES JA, CAMPI-AZEVEDO AC, TEIXEIRA-CARVALHO A et al. Impaired phagocytic capacity driven by downregulation of major phagocytosis-related cell surface molecules elicits an overall modulatory cytokine profile in neutrophils and monocytes from the indeterminate clinical form of Chagas disease. **Immunobiology.** 2012 Oct;217(10):1005-16

GÓMEZ, P. P.; BOVER, R. The New Coagulation Cascade and its Possible Influence on the Delicate Balance Between Thrombosis and Hemorrhage. **Revista Española de Cardiología** v.60, n.12, p.1217-19, 2007.

GRAVES, J. W. Diagnosis and Management of Chronic Kidney Disease. **Mayo Clinic Proceedings**, 83(9):1064-1069, 2008.

GOWDAK, L.H.W; PAULA, F.J.; GIORGI, D.M.A. Doença Cardiovascular e Fatores de Risco Cardiovascular em Candidatos a Transplante Renal. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia** - Volume 84, Nº 2, Fevereiro 2005

HALL, M.N. mTOR—What Does It Do? **Transplantation Proceedings**, 40, S5–S8, 2008.

HALLORAN P.F.; URMSON J.; RAMASSAR V. et al. Lesions of T-cellmediated kidney allograft rejection in mice do not require perforin or granzymes A and B. **Am J Transplant**; v.4, p.705–712, 2004.

HARTMANN E.L., WU C. The evolving challenge of evaluating older renal transplant candidates. **Adv Chronic Kidney Dis.**, 2010, 17(4):358-67.

HASSANIEN, A.A. et.al. Epidemiology of end-stage renal disease in the countries of the Gulf Cooperation Council: a systematic review. **J R Soc Med Sh Rep.**, 2012, 3:38.

HELDAL, K.; HARTMANN, A.; LEIVESTAD, T. et al. Risk variables associated with the outcome of kidney recipients >70 years of age in the new millennium. **Nephrology, Dialysis and Transplantation**, v.1, 2011.

HOFFMAN, M. Remodeling the blood coagulation cascade. **Journal of Thrombosis and Thrombolysis**, v.16 (n.1/2), p. 17-20, 2003.

HOFFMAN, M.; MONROE, D. M. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. **Hematology/ Oncology Clinics of North America**, v. 21, n. 1, p.1-11, 2007.

HOITSMA, A.J.; WOODLE, E.S.; ABRAMOWICZ, D. et al. FTY720: Phase II Transplant Study Group FTY720 combined with tacrolimus in de novo renal transplantation: 1-year, multicenter, open-label randomized study. **Nephrol Dial Transplant.**, 2011, 26(11):3802-5.

HRYSZKO, T.; MALYSZKO, J.; MALYSZKO, J.S. et al. A possible role of thrombin-activatable fibrinolysis inhibitor in disturbances of fibrinolytic system in renal transplant recipients. **Nephrology Dialysis Transplantation**, v.16, p.1692-96, 2001.

HU, H.; KNECHTLE, 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. **Transplantation Reviews**, v.20, n.4, p.165-71, 2006.

HUMAR, A. et.al. Risk factors for slow graft function after kidney transplants: a multivariate analysis. **Clinical Transplantation**, 2002, 16: 425–429.

IRISH, A. Hypercoagulability in renal transplant recipients: Identifying patients at risk of renal allograft thrombosis and evaluating strategies for prevention. **American Journal of Cardiovascular Drugs**, 2004; 4(3):139-49.

JIMÉNEZ, R. et al. Cytometric bead array (CBA) for the measurement of cytokines in urine and plasma of patients undergoing renal rejection. **Cytokine** 32, 2005, 45-50.

JINDAL R.M, RYAN, J.J., SAJJAD I. et al., Kidney transplantation and gender disparity. **American Journal of Nephrology**, v.25, n.5, p.474-483, 2005.

JOSS, N. STAATZ, C.E. et al. Predictors of new onset diabetes after renal Transplantation. **Clinical Transplantation**, v.19, p.136–143, 2007.

JUNG, Y.J. LEE, H.R. KWON, O.J. Comparison of serum cystatin C and creatinine as a marker for early detection of decreasing glomerular filtration rate in renal transplants. **J Korean Surg Soc.**, 2012, 83:69-74.

KANG, D.H. et al. Role of the Microvascular Endothelium in Progressive Renal Disease. **J Am Soc Nephrol** 13: 806–816, 2002.

KARCZEWSKI, J.; KARCZEWSKI, M. et al. Role of TH1/TH2 Cytokines in Kidney Allograft Rejection. **Transplantation Proceedings**, v. 40, p. 3390-3392, 2008.

KARCZEWSKI M, KARCZEWSKI J, PONIEDZIALEK B, WIKTOROWICZ K, GLYDA M. Cytometric analysis of TH1/TH2 cytokines in the urine of patients undergoing kidney transplantation. **Ann Transplant.**2009 Jul-Sep;14(3):25-8.

KAUFMAN, A.; PONTES, L. F. S.; MARQUES, M. T. Q. et al. Anticorpos reativos contra painel em episódios de disfunção do enxerto no transplante renal. **J Bras Nefrol.**, 2003, 25(2):79-85.

KAVANAGH, D.; GOODSHIP, T. Genetics and complement in atypical HUS. **Pediatric Nephrology**, v.25, p.2431–2442, 2010.

KAWAI T, COSIMI A.B. Induction of tolerance in clinical kidney transplantation. **Clin Transplant.**2010 Jul;24 Suppl 22:2-5.

KEW, C.E. 2nd; CURTIS, J.J. The best way to manage hypertension after renal transplantation. **Journal of Renal Nutrition**, 2000, Jan;10(1):3-6.

KLAUS, B.; TRÖGER, M. R.; RUPRECHT, H. D. et al. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 12, p. 1947-1957, 2001.

KOEPPE, B. M.; STANTON, B. A. Berne & Levy – **Fisiologia**.6. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 844p.

KONIJNENBERG A, VAN DER POST JA, MOL BW et al. Can flow cytometric detection of platelet activation early in pregnancy predict the occurrence of preeclampsia? A prospective study. **Am J Obstet Gynecol.** 1997Aug;177(2):434-42.

KUSUMOTA L, RODRIGUES RA, MARQUES S. Elderly persons with chronic kidney failure: health status alterations. **Rev Lat Am Enfermagem**, 2004, 12(3):525-32.

LEE, E. B.; ZHAO, J.; KIM, J. Y.; XIONG, M.; SONG, Y. W. Evidence of potential interaction of chemokine genes in susceptibility to systemic sclerosis. **Arthritis & rheumatism**, v. 56, n. 7, p. 2443-48, 2007.

LENG S, DO K, YINGLING CM et al. Defining a gene promoter methylation signature in sputum for lung cancer risk assessment. **Clin Cancer Res.** 2012;18(12):3387-95.

LEVITSKY J, FREIFELD A, LYDEN E et al. Evaluation of the coagulation and inflammatory responses in solid organ transplant recipients and donors. **Clin Transplant**.2009 Nov-Dec;23(6):943-50.

LEVY, M. N.; KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Berne & Levy – **Fundamentos de Fisiologia**. 4. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 815p.

LEWIS, S. M.; BAIN, B. J.; BATES, I. **Hematologia Prática de Dacie e Lewis**. 9. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 572p.

LIANG, S.C.; TAN, X.Y.; LUXENBERG, D.P. et al. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. **J Exp Med**, 2006, 203:2271-9.

LING, Q. et al. Alternative Definition of Acute Kidney Injury Following Liver Transplantation: Based on Serum Creatinine and Cystatin C Levels. **Transplantation Proceedings**, 39, 3257–3260, 2007.

LIPTAK, P.; IVANYI, B. Primer: Histopathology of calcineurin-inhibitor toxicity in renal allografts. **Nature Clinical Practice Nephrology**, v.2, n.7, p.398-404, 2006.

LOPES G.B., MARTINS M.T.S., MATOS C.M., et al. Comparações de 14. medidas de qualidade de vida entre mulheres e homens em hemodiálise. **Rev Assoc Med Bras**. 2007;53:506-9.

LORENZI, T. F. **Manual de Hematologia: Propedêutica e Clínica**. 4. Ed. São Paulo: MEDSI, 2006.

LU GY, SHEN L, WANG ZY et al. Significance of plasma von Willebrand factor level and von Willebrand factor-cleaving protease activity in patients with chronic renal diseases. **Chin Med J (Engl)**.2008 Jan 20;121(2):133-6.

LUHESHI, N.M.; ROTHWELL, N.J.; BROUGH, D. Dual functionality of interleukin-1 family cytokines: implications for anti-interleukin-1 therapy. **British Journal of Pharmacology**, 2009, 157, 1318–1329.

MACFARLANE, R.G. An enzyme cascade in the blood clotting mechanism, and its functions as a biological amplifier. **Nature**, v. 202 (2), 498–9, 1964.

McKENNA, R.M.; TAKEMOTO, S.K.; TERASAKI, P.I. Anti-HLA antibodies after solid organ transplantation. **Transplantation**, 2000, 15;69(3):319-26.

MALYSZKO, J.S.; MALYSZKO, J.S.; PAWLAK, D.; PAWLAK, K.; BUCZKO, W.; MYSLIWIEC, M. Hemostasis, platelet function and serotonin in acute and chronic renal failure. **Thrombosis Research**, 1996, vol. 83(5), p. 351-61.

MALYSZKO J, MALYSZKO JS, HRYSZKO T, MYSLIWIEC M. Some aspects of hemostasis in kidney transplant recipients maintained on cyclosporine, azathioprine, and prednisone in comparison to patients treated with cyclosporine and prednisone. **Transplant Proc**. 2003 Dec;35(8):2940-2.

MALYSZKO, J.; MALYSZKO, J. S.; et al. Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor in Hypertensive Kidney Transplant Recipients. **Transplantation Proceedings**, v. 38, p.105-107, 2006(a).

MALYSZKO, J.S.; MALYSZKO, J.; HRYSZKO, T.; KOZMINSKI, P.; PAWLAK, K.; MYSLIWIEC, M. Markers of endothelial damage in patients on hemodialysis and hemodiafiltration. **Journal of Nephrology**, vol. 19(2), p. 150-4, 2006(b).

MALYSZKO J, MALYSZKO JS, PAWLAK K, MYSLIWIEC M. Endothelial function and novel adhesion molecule CD44 in kidney allograft recipients. **Transplant Proc.** 2008 Dec;40(10):3470-3.

MANEA M, KRISTOFFERSSON A, SCHNEPPENHEIM R, et al. Podocytes express ADAMTS13 in normal renal cortex and in patients with thrombotic thrombocytopenic purpura, 2007, **Br J Haematol** 138:651–662

MANEA, M.; TATI, R.; KARLSSON, J. et al. Biologically active ADAMTS13 is expressed in renal tubular epithelial cells. **Pediatric Nephrology**, v. 25, p.87–96, 2010.

MANSOUR, I.; MESSAED, C.; AZOURY, M.; KLAYME, S.; NAAMAN, R. Panel-reactive antibodies using complement-dependent cytotoxicity, flow cytometry, and ELISA in patients awaiting renal transplantation or transplanted patients: a comparative study. **Transplant Proc.**, 2001, 33(5):2844-7.

MANZANO, A. M. C.; BUENROSTRO, L. E. M.; ESPINOZA, L. G.; TABLEROS, N. G.; DEL CAMPO, F. M. et al. Markers of inflammation before and after renal transplantation. **Transplantation**, v. 80, n. 1, p. 47-51, 2005.

MASRI, M. A. The mosaic of immunosuppressive drugs. **Molecular Immunology**, v. 39, p. 1073-77, 2003.

MENGEL, M.; SIS, B.; HALLORAN, P.F. Analysis of Banff: Strengths, Weaknesses, Opportunities and Threats of the International Banff Consensus Process and Classification System for Renal Allograft Pathology, **American Journal of Transplantation**, v. 7, p. 2221-2226, 2007.

MENGEL, M. et al. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. **American Journal of Transplantation**, 2012, 12: 563–570.

MOLITORIS, B. A.; SUTTON, T. A. Endothelial injury and dysfunction: Role in the extension phase of acute renal failure. **Kidney International**, v. 66, n.2, p. 496-9, 2004.

MOORE, K.L.; ESMON, C.T.; ESMON, N. L. Tumor necrosis factor leads to the internalization and degradation of thrombomodulin from the surface of bovine aortic endothelial cells in culture. **Blood**, v.73, p.159-65, 1989.

MORESO, F.; IBERNON, M.; GOMÀ, M.; CARRERA, M.; FULLADOSA, X et al. Subclinical rejection associated with chronic allograft nephropathy in protocol biopsies as a risk factor for late graft loss. **American Journal of Transplantation**, v.6, n.4, p.747-52, 2006.

NAPOLI, C.; IGNARRO, L.J. Nitric oxide and pathogenic mechanisms involved in the development of vascular diseases. **Archives of pharmacal research**, v.32, n.8, p.1103-8, 2009.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. **US Renal Data System: USRDS 2010 Annual Data Report: Atlas of Chronic Kidney Disease and End-Stage Renal Disease in the United States**. Bethesda, MD. Disponível em <http://www.usrds.org>. Acesso em 15Jun2012.

NATIONAL KIDNEY FOUNDATION. **K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification**. Am J Kidney Dis., 2002, 39:S1-266.

NATH, D.S.; BASHA, H.I.; MOHANAKUMAR, T. Anti-Human Leukocyte Antigen Antibody Induced Autoimmunity: Role in Chronic Rejection. **Current Opinion Organ Transplant**, v.15, n.1, p.16–20, 2010.

NEIPP, M.; JACKOBS, S.; KLEMPNAUER, J. Renal transplantation today. **Langenbecks Arch Surg**, v.394, p.1–16, 2009

NEWELL KA, PHIPPARD D, TURKA LA. Regulatory cells and cell signatures in clinical transplantation tolerance. **Curr Opin Immunol**. 2011 Oct;23(5):655-9.

NORONHA T.G. et al. Transplante renal: Mecanismos efetores da resposta imune na rejeição aguda ao aloenxerto renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**. 1998; v.20(n.4):496-500.

NORRIS, L.A. Blood coagulation. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology**, 2003, vol. 17(3), p. 369-83.

OLIVEIRA M.B, ROMÃO JUNIOR J.E, ZATZ R. End-stage renal disease in Brazil: epidemiology, prevention, and treatment. **Kidney Int**, 2005; 68:S82-6.

OLIVER, J.; MONROE, D.; ROBERTS, H.; HOFFMAN, M. Thrombin activates factor XI on activated platelets in the absence of factor XII. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 19 (n.1), p.170–7, 1999.

PARK WD, GRIFFIN MD, CORNELL LD, COSIO FG, STEGALL MD. Fibrosis with inflammation at one year predicts transplant functional decline. **J Am Soc Nephrol**. 2010 Nov;21(11):1987-97.

PAWLICKI J, CIERPKA L, KRÓL R, ZIAJA J. Analysis of coagulation parameters in the early period after kidney transplantation. **Transplant Proc**. 2007 Nov;39(9):2754-5.

PAWLICKI, J.; CIERPKA, L.; KRÓL, R. et al. Risk factors for early hemorrhagic and thrombotic complications after kidney transplantation. **Transplantation Proceedings**, 2011, Oct;43(8):3013-7.

PECK AB, NGUYEN CQ. Transcriptome analysis of the interferon-signature defining the autoimmune process of Sjögren's syndrome. **Scand J Immunol**. 2012 Sep;76(3):237-45.

PECOITS-FILHO, R.; HEIMBÜRGER, O.; BÁRÁNY, P. et al. Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients. **Am J Kidney Dis.**, 2003, 41:1212-1218.

PEREIRA, W.A. **Manual de Transplantes de Órgãos e Tecidos**. 3ª edição. Ed. Guanabara Koogan, 642p., 2004.

PEREIRA, A.B.; REZENDE, N.A.; TEIXEIRA JUNIOR, A.L.; TEIXEIRA, M.M.; SILVA, A.C.S. Citocinas e quimiocinas no transplante renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.31, n.4, p.286-96, 2009.

PERUTELLI, P.; MOLINARI, A.C. von Willebrand Factor, von Willebrand Factor-Cleaving Protease, and Shear Stress. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.305-310, 2007.

PLAIN KM, BOYD R, VERMA ND, ROBINSON CM et al. Transplant tolerance associated with a Th1 response and not broken by IL-4, IL-5, and TGF-beta blockade or Th1 cytokine administration. **Transplantation**. 2007 Mar 27;83(6):764-73.

PONTICELLI, C. The mechanisms of acute transplant rejection revisited. **J Nephrol.**, 2012, 25(02): 150-158.

RABELINK, T.J.; BOER, H.C.; van ZONNEVELD, A.J. Endothelial activation and circulating markers of endothelial activation in kidney disease. **Nature Rev. Nephrol**, 2010, 6:404-414.

RAMPINO T, MARASÀ M, MALVEZZI PM, et al. Platelet-Independent defect in hemostasis associated with sirolimus use. **Transplant Proc**. 2004 Apr;36(3):700-2.

REINHOLD, S.W. et al. Elevated urinary sVCAM-1, IL6, sIL6R and TNFR1 concentrations indicate acute kidney transplant rejection in the first 2 weeks after transplantation. **Cytokine** 57, 2012, 379–388.

RIBEIRO, F. et al. Funcionalidade endothelial e aterosclerose: marcadores sanguíneos com utilidade clínica. **Rev Port Cardiol.**, 2009, 28(10), 1121-1151.

RIEGER, M.; MANNUCCI, P.M.; KREMER et al. ADAMTS13 autoantibodies in patients with thrombotic microangiopathies and other immunomediated diseases. **Blood**, v. 106 (n.4), p.1262-7, 2005.

RIOS, D.R.; MOTA, A.P.L.; CARVALHO, M.G. et al. ADAMTS13 and Von Willebrand factor assessment before and after kidney transplantation. **Clinica Chimica Acta** 412, 2011, 2353–2354.

ROSE, B. D.; RENNKE, H. G. **Fisiopatologia Renal**. 1. Ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 1999, 336p.

RUGGERI, Z.M. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 1(n.7), p. 1335-42, 2003.

SAKAGUCHI S, WING K, YAMAGUCHI T. Dynamics of peripheral tolerance and immune regulation mediated by Treg. **Eur J Immunol**. 2009Sep;39(9):2331-6.

SALOMÃO, A. Imunossupressão em transplante renal de adultos: conceitos básicos e aplicação clínica. **Prática Hospitalar**, v.52, p.177-182, 2007.

SBN – Sociedade Brasileira de Nefrologia. **Censo de Diálise SBN 2011**. Disponível em <http://www.sbn.org.br/leigos/index.php?censo>. Acesso em 05 de agosto de 2012.

SCHNAPER HW, KOPP JB. Renal fibrosis. **Front Biosci**. 2003 Jan 1;8:e68-86. **Thromb Res.**, 2005;115(3):219-28.

SEGERER S, NELSON PJ, SCHLÖNDORFF D. Chemokines, chemokine receptors, and renal disease: from basic science to pathophysiology and therapeutic studies. **J Am Soc Nephrol**. 2000 Jan;11(1):152-76.

SEKI Y, TOBA K, FUSE I, et al. In vitro effect of cyclosporin A, mitomycin C and prednisolone on cell kinetics in cultured human umbilical vein endothelial cells. **Thromb Res**. 2005;115(3):219-28.

SEMENTILLI, A.; DAVID, D.R.; MALHEIROS, D. et al. Patologia do transplante renal: achados morfológicos principais e como laudar as biópsias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.44, n.4, p.293-304, 2008.

SESSO, R.; GORDAN, P. Dados disponíveis sobre a doença renal crônica no Brasil. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 29 (1), supl. 1, 9-12, 2007.

SESSO, R.; LOPES, A.A.; THOMÉ, F.S. et al. Relatório do censo brasileiro de diálise 2008. **J Bras Nefrol**. 2008;30:233-8.

SESSO, R. C. et al. Relatório do censo brasileiro de diálise de 2010. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, 33 (4), 442-447, 2011.

SHANG DZ, ZHENG XW, NIIYAM, ZHENG XL. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. **Blood** 2006;108(7):2207–15.

SHEN H, GOLDSTEIN DR. IL-6 and TNF-alpha synergistically inhibit allograft acceptance. **J Am Soc Nephrol**. 2009, 20(5):1032-40.

SILBIGER S, NEUGARTEN J: Gender and human chronic renal disease. **Gend Med** 2008;5(suppl A):S3–S10.

SILVA, P. R. Cardiopulmonary and heart transplantation: 100 years of history and 40 years of existence. **Rev Bras Cir Cardiovasc**, 23(1): 145-152, 2008.

SIS B.; MENGEL M.; HAAS Met al. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. **Am J Transplant**.2010 Mar;10(3):464-71. Epub 2010 Jan 29.

SOLEZ, K.; COLVIN, R.B.; RACUSEN, L.C.; HAAS, M.; SIS, B.; MENGEL, M.; HALLORAN, P.F et.al. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. **American Journal of Transplantation**, v.8, n.4, p. 753-60, 2008.

SOLEZ, K. History of the Banff classification of allograft pathology as it approaches its 20th year. **Curr Opin Organ Transplant**.,2010, 15(1):49-51.

SONODA H, TAKASE H, DOHI Y, KIMURA G. Uric acid levels predict future development of chronic kidney disease. **Am J Nephrol**.2011;33(4):352-7. Epub 2011 Mar 25.

STAUB E. An interferon response gene expression signature is activated in a subset of medulloblastomas. **Transl Oncol**. 2012;5(4):297-304

STENVINKEL P, KETTELER M, JOHNSON RJ, et al. IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly. **Kidney Int**.2005 Apr;67(4):1216-33.

SUZUKI M, MURATA M, MATSUBARA Y, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS-13) in human platelets. **Biochem Biophys Res Commun**2004;313:212–6.

TAIT BD. Solid phase assays for HLA antibody detection in clinical transplantation. **Curr Opin Immunol**.2009 Oct;21(5):573-7.

TERASAKI, P.I.; McCLELLAND, J.D. Microdroplet Assay Of Human Serum Cytotoxins. **Nature**, 1964, Dec 5;204:998-1000.

TONACO, L.; RIOS, D.R.A. et al., Púrpura trombocitopênica trombótica: o papel do fator von Willebrand e da ADAMTS13. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 32(2), p.155-161, 2010.

TORESAN, R. Avaliação da presença de anticorpos anti-HLA no primeiro do transplante renal. Dissertação. Porto Alegre, 2007. 132p.

TRIPODI A. D-dimer testing in laboratory practice. **Clin Chem**. 2011 Sep;57(9):1256-62.

TURUNEN, A.J.; LINDGREN, L.; SALMELA, K.T. et al. Intragraft coagulation events and delayed graft function in clinical renal transplantation. **Transplantation**, 2008, 15;85(5):693-9.

UEMURA M, TATSUMI K, MATSUMOTO M, et al. Localization of ADAMTS 13 to the stellate cells of human liver. **Blood**2005;106(3):922-4.

VOLTARELLI, J.C. et al. **Imunologia Clínica na Prática Médica**. 1ª ed. Editora Atheneu, São Paulo, 1099p., 2009.

WALKER FJ, FAY PJ. Regulation of blood coagulation by the protein C system. **FASEB J**.1992 May;6(8):2561-7.

WEITZ, J.; KOCH, M.; MEHRABI, A.; SCHEMMER, P.; ZEIER, M.; BEIMLER, J.; BÜCHLER, M.; SCHMIDT, J. Living-donor kidney transplantation: risks of the donor-benefits of the recipient. **Clinical Transplantation**, v.20 Suppl 17, p.13-6, 2006.

WOLK, K.; WITTE, E.; WALLACE, E. et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. **Eur J Immunol**, 2006, 36:1309-23.

WOOTLA, B.; NICOLETTI, A.; PATEY, N. et al. Hydrolysis of Coagulation Factors by Circulating IgG Is Associated with a Reduced Risk for Chronic Allograft Nephropathy in Renal Transplanted Patients. **The Journal of Immunology**, v.180, p.8455-8460, 2008.

ZAGO, M.A.; FALCÃO, R.P.; PASQUINI, R. **Hematologia Fundamentos e Prática**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2004. 1081p.

ZBROCH E, MAŁYSZKO J, MAŁYSZKO J, KOC-ŻÓRAWSKA E et al. Renalase, kidney function, and markers of endothelial dysfunction in renal transplant recipients. **Pol Arch Med Wewn**.2012;122(1-2):40-4. Epub 2012 Jan 11.

ZORIO, E.; GILBERT-ESTELLÉS, J.; ESPAÑA, F. et al. Fibrinolysis: the key to new pathogenetic mechanisms. **Curr Med Chem.**, 2008, 15(9):923-9. [Abstract]

*ANEXOS*

## ANEXO A



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

Parecer nº. ETIC 387/09

Interessado(a): **Profa. Luci Maria Sant'Ana Dusse**  
Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia - UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de setembro de 2009, o projeto de pesquisa intitulado "**Marcadores inflamatórios no transplante renal: correlação com parâmetros hemostáticos e genéticos**" 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.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral**  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO B



Universidade Federal de Minas Gerais  
Hospital das Clínicas  
Diretoria de Ensino, Pesquisa e Extensão - DEPE

UFMG

Belo Horizonte, 21 de maio de 2010.

PROCESSO: Nº 092 /09

"MARCADORE "INFLAMATÓRIOS NO TRANSPLANTE RENAL: CORRELAÇÃO  
COM PARÂMETROS HEMOSTÁTICOS E GENÉTICOS"

SR(A) PESQUISADOR(A):

Reportando-nos ao projeto de pesquisa acima referenciado, considerando sua  
concordância com o parecer da Comissão de Avaliação Econômico-financeira de  
Projetos de Pesquisa do HC e a aprovação pelo COEP/UFMG em 02/12/2009,  
esta Diretoria aprova seu desenvolvimento no âmbito institucional.  
Solicitamos enviar à DEPE *relatório* parcial ou final, após um ano.

Atenciosamente,

  
PROF. HENRIQUE VITOR LEITE  
Diretor da DEPE/HC-UFMG

À Sr.  
Prof.<sup>a</sup> Luci Maria Santana Dusse  
Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas  
Faculdade de Farmácia-UFMG

**ANEXO C**

**Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2010.**

**Pesquisadora responsável: Dra. Luci Maria Sant'ana Dusse**


**Numero do Protocolo no CEP: 348/10**

(Este nº. Deverá ser citado nas correspondências referentes a este processo)

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Felício Rocho analisou e aprovou, em reunião realizada em 16 de dezembro de 2010, o projeto intitulado: **“MARCADORES INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS NO TRANSPLANTE RENAL: CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES”**

Deverá ser encaminhado semestralmente um relatório sobre o andamento do Projeto.

Atenciosamente,

  
**Dra. Selme Silqueira de Matos**  
**Coordenadora do CEP/HFR**

**ANEXO D****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(grupo de pacientes transplantados renais)**PROJETO DE PESQUISA****MARCADORES INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS NO TRANSPLANTE RENAL: CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES**

Prezado(a) Senhor(a),

Você está sendo convidado para participar do projeto de pesquisa intitulado “Marcadores Inflamatórios e Hemostáticos no Transplante Renal: correlação com a evolução clínica dos pacientes”. Este estudo tem por objetivo uma melhor compreensão da coagulação do sangue e da inflamação em pacientes submetidos ao transplante renal e é muito importante para entendermos as complicações que podem ocorrer após o transplante.

Neste estudo, serão realizados exames de laboratório dos pacientes transplantados, com o objetivo de estudar as alterações da coagulação do sangue e detectar a ocorrência de inflamação. Você está sendo convidado para constituir o grupo de pacientes transplantados renais.

Para isto, será necessário colher 20 mL do seu sangue, utilizando agulhas e tubos descartáveis. Assim, não há nenhum risco de contaminação para o paciente.

A coleta de sangue será realizada por um profissional com grande experiência, porém, toda coleta pode causar uma leve dor local e, em alguns casos, formar um pequeno hematoma (mancha roxa). Um outro risco associado ao procedimento de coleta de sangue, embora raro, é a ocorrência de lipotímia (desmaio). Nesse caso, os profissionais da coleta adotarão as medidas pertinentes, para as quais estão habilitados.

Todo material colhido será utilizado apenas para esta pesquisa, seu nome nunca será revelado e os resultados dos exames serão utilizados apenas para os fins propostos.

Nenhum exame ou procedimento realizado em função exclusivamente da pesquisa será cobrado. Tais despesas serão de responsabilidade do pesquisador responsável pelo estudo.

Caso queira participar, você deve assinar este Termo, autorizando a coleta do seu sangue.

Você tem a liberdade de se recusar a participar e/ou responder a qualquer pergunta que considere constrangedora ou de retirar o seu consentimento a qualquer momento, sem que haja prejuízos para o seu tratamento. Qualquer dúvida poderá ser esclarecida com a Profa. Luci Dusse (Faculdade de Farmácia/UFMG/ Fone 3409-6880) ou com a farmacêutica Ana Paula Mota (Fone 3409-6900). Desde já, agradecemos sua colaboração.

Prof<sup>a</sup> Luci Maria Sant'Ana Dusse

Farmacêutica Ana Paula Lucas Mota

---

### **Autorização**

Após ter lido o “Termo de consentimento Livre e Esclarecido” e solucionado todas as minhas dúvidas com relação a pesquisa intitulada “Marcadores inflamatórios e hemostáticos no transplante renal: correlação com a evolução clínica dos pacientes”, concordo em participar e autorizo a coleta do meu sangue para fazer os testes laboratoriais previstos na pesquisa.

---

Nome do participante

Belo Horizonte, de de .

---

Assinatura

Comitê de ética em pesquisa da UFMG – COEP  
Av. Presidente Antônio Carlos – Unidade Administrativa II – 2º andar – sala 2005  
Belo Horizonte, MG. Tel (31) 34094592

Comitê de ética em pesquisa – Hospital Felício Rocho  
Av. do Contorno, 9530 - Barro Preto - Belo Horizonte, MG.  
Tel (31) 3514-7001

**ANEXO E****Ficha Clínica**

“MARCADORES INFLAMATÓRIOS E HEMOSTÁTICOS NO TRANSPLANTE RENAL:  
CORRELAÇÃO COM A EVOLUÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES”

Número de identificação do participante: \_\_\_\_\_ Data da coleta: \_\_\_\_\_

**1. Identificação:**

Nome: \_\_\_\_\_

Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: M \_\_\_ F \_\_\_ Naturalidade: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_ Bairro: \_\_\_\_\_

Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ Tel: \_\_\_\_\_

**2. Dados Clínicos:**

a) Peso (Kg): \_\_\_\_\_ Altura (m) \_\_\_\_\_ IMC (Kg/m<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_

b) Por quanto tempo fez hemodiálise? \_\_\_\_\_

c) Doença primária: \_\_\_\_\_

d) Data do transplante renal: \_\_\_\_\_

e) Origem do rim transplantado: \_\_\_\_\_

f) Idade do doador/ sexo: \_\_\_\_\_

g) História familiar de doença renal: \_\_\_\_\_

h) Medicamentos em uso: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

i) Esquema terapêutico imunossupressor/ data de início: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

j) Sintomas clínicos apresentados no momento da coleta de sangue \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**3. Resultados dos exames laboratoriais:**

Hemograma	
Plaquetas	
Biopsia	
PRA (pré-Tx)	
PRA (pós-Tx)	
Colesterol Total e Frações	
Clearance Crea	
Proteinúria	
Crea; Ureia; Ac Úrico	
Infecções pós-Tx	
HLA e GS receptor	
HLA e GS doador	
Íons	
Glicose	
Dosagem do Imunossupressor	
Outros exames	

**4. Outras observações**

## *PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS*

## PARTICIPAÇÃO EM CONGRESSOS



certificamos que:

**ANA PAULA LUCAS MOTA**

participou do



Congresso Brasileiro de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial  
Exposição Técnico-científica

**Medicina Laboratorial - ciência e sustentabilidade**

16 a 19 agosto de 2011  
CentroSul

**Florianópolis**

na qualidade de autor responsável do tema livre "AVALIAÇÃO DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS EM PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIIS", tendo como autores "BORGES, K. B. G. , SILVA, A. C. S. E. , MARTINS-FILHO, O. A. M. , DUSSE, L. M. S. ",

  
João Nilson Zunino  
Presidente do 47º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
Rubens Hemb  
Coordenador de Conteúdo Científico do 47º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
Carlos Alberto Franco Ballarati  
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

realização

 **SBPC/ML**  
 **AMB**  


certificamos que:

## MARIA AUGUSTA AMARAL CAMPOS

participou do



Congresso Brasileiro de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial

Exposição Técnico-científica

**Medicina Laboratorial - ciência e sustentabilidade**

16 a 19 agosto de 2011

CentroSul

Florianópolis

na qualidade de autor responsável do tema livre "**AValiação DO ERITROGRAMA EM PACIENTES ANTES E APÓS O TRANSPLANTE RENAL**", tendo como co-autores "MOTA, A. P. L. , RIOS, D. R. A. , BORGES, K. B. G. , DUSSE, L. M. S. ".

*João Nilson Zunino*

João Nilson Zunino  
Presidente do 45º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

*Rubens Hemb*

Rubens Hemb  
Coordenador da Comissão Científica do 45º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

*Carlos Alberto Franco Ballarati*

Carlos Alberto Franco Ballarati  
Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial

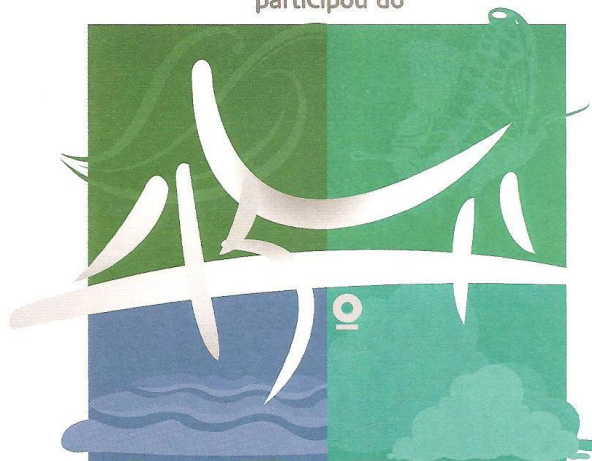
realização



certificamos que:

**DANYELLE ROMANA ALVES RIOS**

participou do



Congresso Brasileiro de Patologia Clínica

Medicina Laboratorial

Exposição Técnico-científica

**Medicina Laboratorial - ciência e sustentabilidade**

16 a 19 agosto de 2011

CentroSul

*Florianópolis*

na qualidade de autor responsável do tema livre "**AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ADAMTS13 E FATOR VON WILLEBRAND ANTES E APÓS O TRANSPLANTE RENAL**", tendo como co-autores "MOTA, A. P. L. , SILVA, A. C. S. E. , BORGES, K. B. G. , DUSSE, L. M. S. ".

João Nilson Zunino

Presidente do 45º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

Rubens Hemb

Coordenador da Comissão Científica do 45º Congresso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

Carlos Alberto Franco Ballarati

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica Medicina Laboratorial

realização



certificamos que

**ANA PAULA LUCAS MOTA**

participou do

Salvador **46°**

**Congresso Brasileiro  
de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial**

Exposição Técnico-Científica

**4 a 7 de setembro de 2012**

Centro de Convenções da Bahia

**A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial**

na qualidade de autor responsável do tema livre "**PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAIAS: AVALIAÇÃO DE CITOCINAS REGULADORAS E PRÓ-INFLAMATÓRIAS EM FUNÇÃO DOS VALORES DE CREATININA**", tendo como co-autores "PINHEIRO, M. B., BORGES, K. B. G., MARTINS-FILHO, O. A. M., DUSSE, L. M. S.".

  
**José Carlos Lima**

Presidente do 46º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Ulysses Moraes de Oliveira**

Coodenador da Comissão Científica do 46º Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Paulo Sérgio Roffé Azevedo**

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /  
Medicina Laboratorial

realização



certificamos que

**ANA PAULA LUCAS MOTA**

participou do

Salvador **46°**

**Congresso Brasileiro  
de Patologia Clínica  
Medicina Laboratorial**

Exposição Técnico-Científica

**4 a 7 de setembro de 2012**

Centro de Convenções da Bahia

**A Evolução do Diagnóstico na Medicina Laboratorial**

na qualidade de autor responsável do tema livre "**PACIENTES TRANSPLANTADOS RENAI: AVALIAÇÃO DE CITOCINAS REGULADORAS E PRÓ-INFLAMATÓRIAS**", tendo como co-autores "PINHEIRO, M. B., BORGES, K. B. G., MARTINS-FILHO, O. A. M., DUSSE, L. M. S."

  
**José Carlos Lima**

Presidente do 46° Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Ulysses Moraes de Oliveira**

Coordenador da Comissão Científica do 46° Congresso  
Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

  
**Paulo Sérgio Roffé Azevedo**

Presidente da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica /  
Medicina Laboratorial

realização



## XXIVth Congress of the ISTH: Confirmation of abstract submission

---

[isth2013@mci-group.com](mailto:isth2013@mci-group.com)

2  
fev

[de.isth2013@mci-group.com](mailto:de.isth2013@mci-group.com)

Thank you for submitting your abstract for the XXIVth Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis.

This e-mail is a confirmation of your abstract submission. Please find an overview of your submitted data below.

In case of any questions, please contact us by e-mail at [isth2013@mci-group.com](mailto:isth2013@mci-group.com).

With kind regards,

MCI

ISTH Congress Secretariat

Jan van Goyenkade 11

NL-1075 HP Amsterdam

The Netherlands

**You have submitted the following data:**

*(Please note that in this preview not all data will appear as submitted by you. We will use all data when making the abstract book, so do not worry if names/departments are missing,)*

**Abstract title** Hypercoagulability markers in renal transplanted patients: association to inflammatory response

*ARTIGOS*

## ARTIGOS PUBLICADOS

Clinica Chimica Acta 412 (2011) 2353–2354



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Clinica Chimica Acta

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/clinchim](http://www.elsevier.com/locate/clinchim)

## Letter to the Editor

**ADAMTS13 and Von Willebrand factor assessment before and after kidney transplantation**

Dear editor,

A desintegrin-like and metalloprotease thrombospondin type 1 motif, member 13 (ADAMTS13) is a plasma zinc metalloprotease that cleaves von Willebrand factor (VWF) [1]. VWF is a large protein synthesized in endothelial cells and megakaryocytes and respectively stored in Weibel-Palade bodies and granules. VWF is formed in these compartments as ultra large and very active VWF multimers [2]. As soon as these ultra large multimers (UL-VWF) are release on the plasma, ADAMTS13 specifically cleaves the bond between amino acids Tyr1605 and Met1606 in the A2 domain of them reducing their mo-

occurred only in liver [5–7]. In 2004, ADAMTS13 was detected in platelets [8] and in 2006 in endothelial cells [9]. More recently, ADAMTS13 mRNA was also detected in kidney, including glomerular endothelial cells, podocytes, glomerular basement membrane, tubular epithelial cells [10]. Although other sources of ADAMTS13 have been described, their relevance to the pathogenesis of thromboregulation remained unknown.

Regarding the significance of these other sources of ADAMTS13 our data indicated lower ADAMTS13 levels in severe renal dysfunction. A previous study from our group found reduced levels of ADAMTS13 and pregnant with severe preeclampsia [11]. This disease is associated to a renal impairment and proteinuria. According to our data, other studies related lower ADAMTS13 antigen in preeclampsia or in its outcome as syndrome HELLP [12,13].

In agreement with our hypothesis, reduced levels of ADAMTS13

Cytokine 62 (2013) 302–309



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Cytokine

journal homepage: [www.journals.elsevier.com/cytokine](http://www.journals.elsevier.com/cytokine)

## Cytokines signatures in short and long-term stable renal transplanted patients

Ana Paula Lucas Mota<sup>a</sup>, Sandra Simone Vilaça<sup>b</sup>, Fernando Lucas das Mercês Jr.<sup>c</sup>,  
Melina de Barros Pinheiro<sup>a</sup>, Andréa Teixeira-Carvalho<sup>d</sup>, Amanda Cardoso Oliveira Silveira<sup>d</sup>,  
Olindo Assis Martins-Filho<sup>d</sup>, Karina Braga Gomes<sup>a</sup>, Luci Maria Dusse<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>b</sup>Hospital Felício Rocho, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Departamento de Nefrologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

<sup>d</sup>Laboratório de Biomarcadores de Diagnóstico e Monitoração – Centro de Pesquisas René Rachou-Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 October 2012

Received in revised form 27 February 2013

Accepted 3 March 2013

Available online 2 April 2013

## ABSTRACT

Despite the evidences showing the relevance of regulatory immune-mediated mechanisms to guarantee the stable graft function in renal transplanted patients, studies focusing on the immune response observed over a long-term period after renal transplantation are still limited. Several efforts have been done to establish novel biomarkers with relevant predictive values that could be used as prognostic laboratory tools to monitor the complex network triggered through time after kidney transplantation. In